

29.09.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 22 NOV 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年10月 2日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第296095号

出願人

Applicant(s):

財団法人化学及血清療法研究所

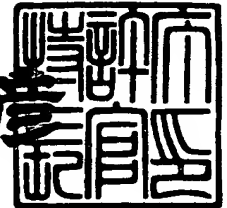
E U

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年11月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3075845

【書類名】 特許願

【整理番号】 P10-007

【提出日】 平成10年10月 2日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志殿

【国際特許分類】 A61K 37/48
C12N 9/00

【発明の名称】 癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素および当該酵素により断片化された血漿蛋白断片

【請求項の数】 14

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市楠7丁目14-29

 【氏名】 森河 亘

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県上益城郡御船町御船719番地

 【氏名】 上仲 一義

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市下碓川町1619-2 碓川ハイツ

 【氏名】 嶽本 澄代

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市壺川1丁目1-12 栄久ハイツ

 【氏名】 前田 浩明

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市武蔵ヶ丘5丁目26-1

 【氏名】 野崎 周英

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋2066-8

 【氏名】 宮本 誠二

【特許出願人】

 【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所

【代表者】 酒匂 光郎

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素および当該酵素により断片化された血漿蛋白断片

【特許請求の範囲】

【請求項1】 癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片産生酵素。

【請求項2】 下記の性状を有する請求項1記載の血漿蛋白断片産生酵素。
(a)非還元系SDS電気泳動で約45kDaの分子量を示し、(b)N末端のアミノ酸残基がLVRIPLHKFTであって、(c)pH5.0以下の酸性域で血漿蛋白に作用して癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片を産生し、そして(d)カテプシンD前駆体と高い相同性を示すアスパラギン酸酵素である。

【請求項3】 前記被断片化血漿蛋白が、プラスミノゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン及びヒト肝細胞増殖因子(HGF)より選択される請求項1または請求項2記載の血漿蛋白断片産生酵素。

【請求項4】 プラスミノゲンの73L-74F及び/または451L-452P間の結合を切断し、プラスミノゲンのクリングル1~4を含む断片を遊離させ得る請求項1~請求項3のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素。

【請求項5】 請求項1~請求項4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素の作用によって産生される癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片。

【請求項6】 プラスミノゲン、フィブロネクチン、ビトロネクチン及びヒト肝細胞増殖因子(HGF)より選択される血漿蛋白に由来するものである請求項5記載の血漿蛋白断片。

【請求項7】 プラスミノゲンのクリングル1~4を含む断片よりなる請求項5または請求項6に記載の血漿蛋白断片。

【請求項8】 フィブロネクチンヘパリン結合部を含む断片よりなる請求項5または請求項6に記載の血漿蛋白断片。

【請求項9】 請求項1~請求項4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を作用させることを特徴とする、癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片の調製方法。

【請求項10】 ヘパリン担体を利用したレジンを用いて癌転移増殖抑制作用

を有する血漿蛋白断片を特異的に分離する工程を含む、請求項9記載の血漿蛋白断片の調製方法。

【請求項11】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を主たる構成成分とする、癌(固形癌)、糖尿病性網膜症、リウマチ等血管新生に関与する病態の治療及び予防用薬剤。

【請求項12】 請求項1～請求項4のいずれかに記載の血漿蛋白断片産生酵素を主たる構成成分とする癌の治療及び予防用薬剤。

【請求項13】 請求項5～請求項8のいずれかに記載の血漿蛋白断片を主たる構成成分とする、癌(固形癌)、糖尿病性網膜症、リウマチ等血管新生に関与する病態の治療及び予防用薬剤。

【請求項14】 請求項5～請求項8のいずれかに記載の血漿蛋白断片を主たる構成成分とする癌の治療及び予防用薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、生化学的に活性な酵素、該酵素によって産生される生物活性を有する血漿蛋白断片、該血漿蛋白断片の調製方法及びそれらを用いた癌治療法の一形態に関する。詳細には、プラスミノゲンあるいはフィブロンectin分子種等の血漿蛋白質を分解し癌転移増殖抑制作用を有する断片を産する酵素、当該酵素を用いて得られる癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白質断片、及び当該血漿蛋白質断片の調製法に関する。従って本願発明は、前記酵素及び当該酵素によって断片化される血漿蛋白質断片に生化学あるいは医学的意義が存する分野、例えば癌の治療薬、予防薬の分野において広く利用される。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

現在の癌に対する外科的治療技術はめざましいものがあり、原発巣の術的切除治療に関してはほぼ完成された域に達したと評価され得る。しかし、臨床上の術後の癌の再発、転移増殖といった課題に対してはまだ解決すべき問題は多く、特に遠隔転移増殖は癌患者を死に至らせる最大の原因となっている。

癌の転移増殖とは、原発巣から癌細胞が離脱し血管系を経て他の部位で癌が増殖することである。血管系で拡散された癌細胞が広範囲に増殖する状況では、いかに進歩した術的治療であってもこれを完全に取り除くことは不可能に近い。そのため、抗癌剤に代表される化学療法がこの予防、治療に用いられている。しかしこの場合も、化学物質に対する薬剤耐性の問題が避けられず、有効性の発現のための投与量の増大、それに伴う副作用の増大と問題は大きい。多くの技術がこれら諸問題の解決に費やされている一方で、癌細胞が血管系に進入することを抑制しようとする研究も現在活発に展開されている。癌浸潤抑制、血管新生阻害の研究がそれである。

【0003】

癌細胞が血管系へ進入する経路は大きく2つに分けられるが、そのうち一つは癌細胞が血管側へ移行する経路、他方は血管を癌局部に導き入れる経路である。前者は癌の浸潤と呼ばれており、後者は血管新生と呼ばれる。癌浸潤とは、転移増殖能力を獲得した癌細胞が原発巣（腫瘍）から離脱し、癌細胞と血管とを遮る間質というバリアーを分解し、さらにその間隙に浸潤して血管系に入りこむ現象である(Mignatti P, et al., J. Cell Biol., vol. 110, p. 671-682, (1989))。

【0004】

一方、血管新生とは、既存血管から新たな血管が生じる現象であり、この血管（新生血管）を通して癌は血流中へ移行する。血管新生は健常状態の成人個体では、女性の性周期あるいは創傷治癒時以外には認められず、主に、癌、糖尿病性網膜症、リウマチ、乾せんといった病的状態で生じる(Folkman J., Adv. Cancer Res., vol. 43, p. 175-203, (1985); Zetter B.R., Chest, vol. 93 (Suppl.), p. 159S-166S, (1998); Patz A., Invest. Ophthalmol. Visual Sci., vol. 19, p. 1133-1138 (1980); Amore D, et al., Ann. Rev. Physiol., vol. 49, p. 453-464, (1987))。癌細胞（腫瘍）は、自らの増殖に必要な酸素や栄養を供給するために新しい血管を既存血管から導き入れるが、この血管（新生

血管)は癌細胞の血管系への移行をより容易なものとしている。これら血管新生は癌細胞によって刺激を受けた血管内腔に敷き詰められた血管内皮細胞の異化によるものであるが、これらが癌細胞に到達し新しい血管を形成するまでには、癌の浸潤過程と同様に基底膜の消化、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成といった多段階的な行程を経る。癌細胞が血管系へ進入する経路を阻害し転移増殖を抑制するという研究とは、換言すれば、以上示したいずれかの行程を阻害することである。このうちのどの行程に焦点を当てるかについては議論があるところであるが、癌浸潤と血管新生に共有する間質の分解消化という過程は最も注目されるものである。

【0005】

間質の分解阻害

癌細胞と血管内皮細胞との間には、タイプIVコラーゲンよりなる基底膜とコラーゲン類よりなる細胞外マトリックスが細胞浸潤のバリアーとして存在している。そのため、癌細胞が血流中に進入するためには、あるいは血管内皮細胞が癌細胞に到達するためにはこのバリアーを消化、分解しなければならない(Stetler-Stevenson W.G., et al., Ann. Rev. Cell Biol. vol. 9, p. 541-573, (1993))。これら分解酵素がマトリックス分解酵素と呼ばれる一群の酵素であり、コラゲナーゼ等がこれらに該当する(Woessner, J.F. Jr., FASEB J., vol. 5, p. 2145-2154, (1991))。一般に癌部位ではこのマトリックス分解酵素が過剰発現しており、かつ活性化に関わるセリンプロテアーゼの過剰発現が認められる。さらに、癌部位では、活性阻害物質であるTIMP(Tissue Inhibitor of Metallo Protease)の発現低下が認められるため、酵素と阻害剤の関係に不均衡が生じ、癌細胞に転移増殖の環境を提供することが報告されている(Rak J., et al., Cancer Res., vol. 55, p. 4575-4580, (1995))。そのため、この不均衡を是正するため、例えば、癌細胞にTIMP-I遺伝子を導入したりマトリックス分解酵素を阻害する薬剤を投与する試みがなされており、このうち例えばゼラチナーゼの阻害剤であるBB-94が実験的な転移増殖を抑制し、かつ血管新生を抑制す

ることによって癌の増殖を抑制したとの良好な報告も多くなされている(Davis, B., et al., Cancer Res., vol. 53, p. 2087-2091, (1993); Rasmussen, H.S., Proceedings of the ICS 2nd. International conference on protease inhibitors, International business communications, (1997))。

【0006】

プラスミンと癌の関係

マトリックス分解酵素は一般に酵素前駆体の形態で細胞外に放出されており(Chen, W.T., Curr. Opin. Cell Biol., vol. 4, p. 802-809, (1992))、活性化に関わる当該酵素を阻害することによって間質の分解を阻害するという試みがある。マトリックス分解酵素はセリンプロテアーゼによる限定分解によって初めて活性化される性質をもつため、このセリンプロテアーゼを阻害することがそれに当たる。マトリックス分解酵素を活性化するセリンプロテアーゼとしてはプラスミン、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター(以下、u-PA)、組織型プラスミノーゲンアクチベーター(以下、t-PA)、及びトリプシンなどがあり、特に血液線溶系の酵素であるプラスミンは癌細胞及び血管内皮細胞で活性化される共通の酵素である点で注目される。つまり、プラスミンとはその前駆体であるプラスミノーゲンがu-PA、t-PA等のプラスミノーゲンアクチベーターによって切断を受け活性化されたものであるが、癌細胞はu-PA産生能力を、血管内皮細胞はt-PA産生能力を有しており、癌状態ではともに高レベルで発現されているとの報告がある。

【0007】

また、プラスミンには上述のマトリックス分解酵素を活性化させる以外に、例えば血管新生に関与する因子であるTGF- β の活性化作用や自ら細胞外のマトリックスを分解する能力を持っている(Werb Z., et al., N Engl. J. Med., vol. 296, p. 1017, (1977); Brunner G., et al., J. Cell Biol., vol. 6, p. 1275-1283, (1991))。さらに、プラスミンはフィブリン膜で癌を取り囲みその分散を抑制しようとする宿主側の防御機構を破る能力を有していると考えられている。

以上の結果を考慮すれば、プラスミンの発現は癌存在部位においては浸潤を促す方向に傾いていると推察される。実際、プラスミンの阻害剤が実験動物の癌転移増殖を抑制したとする知見も報告され、このことを裏付けている(Ohta T., et al., Gann to rinshou, vol.23, p.1669-1672, (1996); Ohkoshi M, Gann to kagakuryo uh ou, vol.22, p.417-430, (1995))。

【0008】

プラスミンの癌転移増殖抑制作用

一方、プラスミノゲンまたはプラスミンを断片化した物質に癌の増殖あるいは浸潤を抑制する作用があることが報告されている。すなわち、血管新生阻害物質(アンジオスタチン)に関する報告がそれである(O'Reilly M.S., et al., Cell, vol.79, p.315-328, (1994))。アンジオスタチンはプラスミノゲンの内部断片からなる血管新生阻害物質であり、微量で血管新生及び癌転移増殖増殖を強力に阻害する作用を有しており、さらに、驚くべきことに副作用、薬剤耐性もなく量依存的に癌(原発巣)を退縮させる能力を持つ(O'Reilly M.S., et al., Nat. Med., vol.2, p.689-692, (1996))。アンジオスタチンに関してはO'Reilly等の詳細な実験によって血管新生及び癌抑制の関係が示されている。しかし、それらに対するアンジオスタチンの作用機作、およびその産生に関しては未だ不明な点が多い。

【0009】

前述の知見は、プラスミンの産生は癌転移増殖を導きプラスミノゲンまたはプラスミンの断片化はそれを抑制するという仮説を示唆するものである。癌状態ではこれらのバランスが崩れ癌転移増殖の方向に向いているとすれば、これを断片化方向へ転換することによって癌転移増殖を抑制することができる。つまり、プラスミノゲンまたはプラスミンを切断し、かつ上述のアンジオスタチン様分子を産生する酵素が癌の進展に対する生体側の防御機構として備わっているはずである。本願発明者は上述の仮説の真偽を証明するべく、プラスミノゲンまたはプラスミンを断片化しアンジオスタチン様分子を産生する酵素の探索を行っ

た。

【0010】

【課題を解決するための手段、発明の構成】

上述の課題を解決する目的で鋭意検討の結果、本願発明者は、前立腺癌細胞株である PC-3 培養液中に pH が低い環境でのみプラスミノーゲンを断片化する新しい酵素活性を見出した。本酵素によって産生されるプラスミノーゲン断片はプラスミノーゲンクリングル 1~4 を含む断片であり、また、本酵素はプラスミンの活性中心付近を切断することによりその活性を失わせることも明らかになった。前記活性は癌細胞で多く発現されており、癌に対する特異性が示唆された。

各種のクロマトグラフィーに基づいて精製した結果、本酵素は分子量約 45 kDa の酵素であり、N 末端アミノ酸配列は LVRIP LHKFT から始まり、この N 末端配列はヒトカテプシン D 前駆体 (Human Cathepsin D Precursor) に高い相同性を示すことが判明した。また、阻害剤を用いた検討によりアスパラギン酸酵素に分類されることが判明した。本願発明者等は得られた本酵素を低 pH で活性発現することに因み、PACE 4 (Plasminogen Angiostatin Converting Enzyme of pH4) と命名した。

【0011】

さらに、PC-3 培養上清から精製した本酵素をプラスミノーゲンに作用させて得られたプラスミノーゲン断片を、ルイス肺癌を移植したマウスモデルに投与した結果、当該断片に癌細胞の転移増殖抑制作用があることが確認された。また、多くの血漿成分を本酵素で切断し、得られる断片をその血管新生阻害作用に着目してスクリーニングを実施した結果、前述のプラスミノーゲン以外にも、細胞接着に関与する成分であるフィブロネクチン、ビトロネクチンあるいはヒト肝細胞増殖因子 (HGF) 等の血漿蛋白が本酵素によって断片化され、当該断片化血漿蛋白が強い血管新生抑制作用を示すことが見出された。

【0012】

当該酵素活性の発見

アンジオスタチン様分子を産生し且つプラスミンの活性を失わせる酵素を探索するための優先的方策は、先ず、アンジオスタチンの産生酵素を見出すことであ

る。既報によれば、アンジオスタチンはルイス肺癌の亜種である3LL-LMを移植されたマウスの血漿、尿中に見出されており、当該マウスの体内にはアンジオスタチンを産生する酵素が存在する筈である。O'Reilly等は、悪性腫瘍摘出後希に認められる遠隔転移増殖巣の急速な増殖に着目して3LL-LM細胞を用いたモデルを作製し、その血漿、尿中に強力な血管新生阻害因子を見出し、アンジオスタチンの発見に至った。癌状態では原発巣(癌)に由来する因子が血流内を循環し遠隔転移増殖巣の増殖を抑制しているというものである。また、アンジオスタチンに限って言及すれば、癌細胞はプラスミノゲンを産生しないことから癌細胞に由来する酵素が血中のプラスミノゲンを切断し、アンジオスタチンを産生させている、と推察することができる。

【0013】

アンジオスタチンを産生する酵素については各研究施設から種々の候補が報告されている。Gately等は、近年、ヒト前立腺癌細胞(PC-3細胞)の細胞培養上清中にアンジオスタチンを断片化する活性があることを報告し、この活性をもたらす酵素をPACE(Plasminogen Angiostatin Converting Enzyme)と命名した(Gately S, et al., Cancer Res., vol.56, p.4887-4890, (1996))。PC-3細胞は、癌の原発巣の摘出が逆に遠隔転移増殖巣の増殖を促進させる特徴を持つヒト型の細胞であり(Soff G. A., et al., J.Clin. Invest., vol.96, p.2593-2600, (1995))、この癌細胞が産生するヒトアンジオスタチン及びアンジオスタチン産生酵素(PACE)は注目されるものである。また、彼らはプラスミノゲンとPC-3培養上清とを反応させることによって得られるプラスミノゲン断片を調製し、この断片がO'Reilly等の報告したアンジオスタチンと同等の血管新生阻害効果を有することをin vitro、in vivoの系で示した。

また、癌環境に認められるマクロファージの浸潤に着目し、マクロファージに由来する酵素(マトリックスメタロエラスターゼ)がアンジオスタチンを産生させる酵素であることを明らかにしたDong等の報告(Dong Z et al., Cell, vol.88, p.801-810, (1997))、及びMMPのスクリ

ーニングの中でその活性が認められた Brain 等の MMP-7、MMP-9 に関する報告もある (Brain C et al., J. Biol. Chem., vol. 272, p. 28823-28825, (1997))。

【0014】

しかし、当時、Gately 等の PACE はその活性のみの評価であり、その活性の本態である酵素については単離・確認されていない状況であった。従って、本願発明者等は当初 PACE を単離・精製することを目的として Gately 等の実験を追試した。確かに、Gately 等の方法によって調製した PC-3 培養上清をプラスミノゲンに反応させた場合、アンジオスタチンに相当する 50 kDa に分布するプラスミノゲンの断片化物が SDS-PAGE 上で確認できた。しかし、この切断様式は特異性に乏しく、少なくとも PACE がプラスミノゲンを特異的に切断しているとは断言できないものであった。

【0015】

本願発明者等は独自のスクリーニング系を構築し、所望の当該酵素の単離・精製を試みた。鋭意検討の結果、幸いにも、PC-3 培養上清中には中性域でプラスミノゲンを断片化する酵素の他に、低い pH の条件下でプラスミノゲンの限定部位を特異的に切断し得る、Gately 等の PACE とは全く異なる従来報告されていない酵素活性を見出すことに成功した。この酵素の切断様式は図 1 に示すように、PACE の非特異的な切断とは異なり、プラスミノゲンの限定部位を特異的に切断するものであった。

本願発明者等は以前より癌状態における低 pH に着目しており、エラスターゼで切断したある種のプラスミノゲン断片が低 pH 環境部位に集積する可能性について報告した (第 56 回日本癌学会総会抄録、p. 426、1997 年)。また、この低 pH で作用する酵素が癌状態と関係する知見を、各種癌細胞及び正常細胞を用いた酵素活性の検討によって見出しており、この酵素が癌状態でのみ大量に産生されることを予備的な検討によって察知していた。前述のように、本願発明者のスクリーニングの目的は、「プラスミンを切断し、そのプラスミン活性を消失させ得るアンジオスタチン様分子を産生する酵素が癌の進展に対する生体側の防御機構として備わっている筈」との仮説を証明することである。この低 pH

条件でのみ作用する酵素こそが前記仮説における「酵素」である可能性が高く、本願発明者等は新たに当該酵素の単離精製を開始した。

なお、Gately等は最近、前述のPACEの本態を単離することに成功し、これらがプラスミンと遊離のシステインドナーに起因する結果であることを報告した(Gately S., et al., Proc.Natl.Acad.Sci., vol.94, p.1068-1087, (1997))。

【0016】

本願発明の酵素の探索

本願発明の酵素の最大の特徴は、プラスミノゲン及びフィブロンネクチン等の血漿蛋白質の限定部位を特異的に切断する能力である。本願発明者は先ず当該酵素の癌細胞との関係を明らかにする目的で当該酵素の探索及びその単離に着手した。

【0017】

本願発明者等は、先ず、プラスミノゲンの断片化率をより高感度に検出するスクリーニング系を構築し、当該スクリーニング系を用い各種のクロマトグラフィーの組み合わせによって目的の酵素が精製できることを明らかにした。本願発明のプラスミノゲン断片化酵素のスクリーニング系の概念図を図2に示した。本方法はサンドイッチELISAを応用したものであり、固相化抗体としてプラスミノゲンリジン結合部I (Plasminogen Lysine Binding Site I、以下LBS I)に対する特異抗体を用い、標識抗体としてミニプラスミノゲン(Mini Plasminogen、以下mPlg.)に対する特異抗体を使用することを特徴とするものである。既知量のプラスミノゲンに目的の酵素が接触するとプラスミノゲンは断片化され標識抗体が認識する部分が消失することによってELISAの発色値が低下する。この発色の低下をもって酵素活性を評価する方法である。

【0018】

本願発明の酵素の調製

目的の酵素の調製は、PC-3培養上清を出発原料とし陽イオン交換体、ヘパリンクロマトグラフィー、陰イオン交換体、ゲル濾過、ハイドロキシアパタイトからなる一連のクロマトグラフィー操作によって達成された。最初の陽イオン交

換体による処理は、主に夾雑する一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター (singlechain urokinase-type plasminogen activator; scu-PA) を除去する目的で行い、ヘパリンクロマトグラフィーはセリンプロテアーゼ群の除去に用いた。scu-PAはプラスミノーゲンアクチベーターの前駆体でありプラスミンの存在によって活性化され活性型のu-PAとなり、u-PAは中性域でプラスミノーゲンを断片化するため、所望の酵素の精製に際しては初期に除く必要がある。本願発明の酵素は疎水クロマトグラフィーにより良好な分離を認める。図3に典型的な疎水クロマトグラフィーのクロマトグラムを示した。白丸は吸光度を、黒丸は酵素活性そして波線はイオン強度を示す。図のように疎水性の異なる2種類の酵素活性がPC-3培養上清中に認められる。このうち、疎水性の高い部分(クロマトグラムの後半)の酵素活性にプラスミノーゲンを特異的に切断し、クリングル1~4を含むプラスミノーゲン断片を産生する酵素活性が認められた。なお、疎水性の低い部分(クロマトグラムの前半)の酵素活性はプラスミノーゲンを非特異的に断片化するものであり、単離精製した結果、カテプシンE (cathepsin E) と相同性が高い蛋白であることが見出された。

【0019】

本願発明の酵素の分子量をゲル濾過クロマトグラフィーで分離検討した結果、約50から60kDa付近で活性が回収される。本願発明の酵素のSDS-PAGEによる解析結果を図4に示した。図のように分子量45kDaに相当する位置に活性を示すバンドが認められた。なお、事項で記述するように本願発明の酵素がアスパラギン酸酵素であることが判明したことから、本願発明の酵素は最終的にペプスタチンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーで精製した。

本願発明の酵素の調製に関しては、上述のPC-3培養上清からの調製その他、遺伝子組換え技術により当該酵素産生細胞を構築し、これより産生される当該酵素を調製する方法、即ち、当該酵素をコードする遺伝子を好適なベクター等を用いて原核細胞、真核細胞、ほ乳動物細胞または昆虫細胞等適当な宿主に導入し、これより調製する方法も現実的な調製手段として十分に考慮され得る。

【0020】

本願発明の酵素の性状

本願発明の酵素の阻害様式を図5にまとめた。各種インヒビターの濃度はアプロチニン(0.3 μ M)、ベンツアミジン(10 mM)、エラスチナル(100 μ M)、ペプスタチンA(1 μ M)、EDTA(10 mM)である。図に示されるように本酵素活性はアスパラギン酸酵素の特異的阻害剤であるペプスタチンAによって完全に阻害された。また、図6は反応時のpHを中性域、酸性域に調整した際のプラスミノゲンの断片化を示したものであるが、図のように本願発明の酵素は酸性域でのみプラスミノゲンを断片化する。図中矢印A(\rightarrow A)はGately等が示したPC-3由来のアンジオスタチンを、矢印B(\rightarrow B)はPACE4によって産生されたプラスミノゲンクリングル1~4を含む断片に相当する。図7には本願発明の酵素によるプラスミノゲンの切断部を示した。プラスミノゲンはA(プラスミノゲンクリングル1~4部分)、B(ミニプラスミノゲン部)及びC(ミニプラスミノゲン断片化部分)に切断され、各画分のN末端アミノ酸を解析した結果、AはF-74、BはP-452そしてCはA-700であった。本願発明の酵素はプラスミノゲンのN末端から451番目のロイシンと452番目のプロリン間(以下、451L-Pと表記する)を切断し、かつN末端73番目のロイシンと74番目のフェニルアラニン間(以下、73L-Fと表記する)を切断することによってプラスミノゲンのクリングル1~4部を含む断片を遊離する。なお、生体中に循環するプラスミノゲンはそのN末端がGluで始まる完全型であるが、そのうち数%が一部断片化を受けている。この断片化された分子種はN末端が78Lysで始まりLysプラスミノゲンと呼ばれる。本願発明の酵素は完全型のプラスミノゲンのほかにも、Lysプラスミノゲンを良好な基質として断片化するため、遊離されるクリングルのなかにはそのN末端アミノ酸残基が78Lys、80Valである場合もある。

【0021】

さらに、本願発明の酵素はクリングル1~4部を含有するアンジオスタチンを産生するとともに、プラスミンの活性中心付近(699番目フェニルアラニン-700番目アラニン間)を切断し、プラスミンの活性を消失させることができる。この切断様式は癌の進展を有効に抑制する上で極めて興味深い点である。即ち

、癌の増殖を抑制するアンジオスタチンはプラスミノゲンの断片化によって生ずると考えられるが、同時に産生される残りのプラスミン活性中心部分(プラスミンセリンプロテアーゼドメイン)が癌の進展を助長する可能性があるからである。また、前述したように、プラスミン活性は血管新生及び癌の浸潤を亢進するが、このクリングル部を除くことはその進展をさらに悪化させる可能性がある。なぜなら、クリングル部が失われることによって生体内に存在するプラスミン阻害蛋白質の作用が減弱してしまうからである。すなわち、プラスミンの阻害蛋白質であるアルファ2プラスミンインヒビター(以下、 $\alpha 2-P I$)の作用抑制がこれにあたる。血漿中のプラスミンは血流を巡回する $\alpha 2-P I$ によって即座に不活化されるが、この過程において、クリングル部はプラスミンと $\alpha 2-P I$ との結合において重要である。この部分の欠落は $\alpha 2-P I$ の作用を半減させるため、阻害を受けない活性型のプラスミン断片が拡散によって癌周辺のマトリックスの分解酵素に作用し、癌の進展・転移増殖を促進する可能性があるからである。本願発明の酵素は、プラスミノゲンのクリングル1~4部分を産生するとともに、残存するプラスミン活性を消失させる点が他に報告されているアンジオスタチン産生酵素とは異なる点であり、本願発明の酵素が例えば生体保護の役割を果たしているとするれば、最も有力視される酵素候補である。図8に本願発明の酵素によるプラスミノゲンの経時的な切断と残存プラスミン活性との関係を示した。AはプラスミノゲンをPACE4で断片化した際のSDS-PAGEを、Bは同被検試料のプラスミン活性を測定したものである。図で示されるように切断とともにプラスミン活性が失われるのが理解される。上述の結果は、本願発明の酵素が生体に有利に作用することを示唆するものであり、この点に着目すれば、本願発明の酵素が作用する基質蛋白質はプラスミノゲンに限らないことが予想される。本願発明者等は、この可能性も同様に明らかにするため、事項以下に示す血漿蛋白質についても同様に断片化を実施し、本願発明の酵素でプラスミノゲンと同等あるいはそれ以上の活性を有する断片を調製することに成功した。

【0022】

本願発明の酵素の同定

精製された酵素標品をSDS-PAGEによる電気泳動を行った後、GVDF膜にトランスブロットした。トランスブロット後の膜はアミドブラックで染色後、それぞれ45kDaに相当するバンド部分を切り出し、アミノ酸配列分析装置でN末端からの配列を解読した。その結果、45kDaに相当するバンドの配列はLVRIPLHKFTであった。得られたアミノ酸配列を既存のアミノ酸データバンクで照合した結果、当該酵素のN末端アミノ酸残基はヒトカテプシンD前駆体に相同することが判明した。また、イムノブロットの手法を用いて精製した酵素を抗ヒトカテプシンD抗体で反応させた結果、当該酵素はこの抗体に反応したことから、本酵素がヒトカテプシンD前駆体に高い相同性を示すことが推察された。

カテプシンDは、全アミノ酸を有するカテプシンD前駆体の状態で産生され、リソゾーム中で他の酵素によって切断を受け、活性型のカテプシンDに変換される。ヒト乳癌に代表される悪性腫瘍がカテプシンD前駆体を細胞外へ放出することは数多く報告されているが、仮に本願発明の酵素がカテプシンD前駆体であったとしても、カテプシンD前駆体が前駆体の形態でプラスミノゲンを切断することについては全く新しい知見であり興味ある点である。

PACE4調製の出発材料として用いたPC-3細胞から調製したmRNAを基に合成したcDNAを用い、カテプシンDのcDNA配列より全長の翻訳領域を増幅するためのセンスとアンチセンスプライマーを合成し、AmpliTaq(PERKIN ELMER社)を用いて増幅後、TA cloning kit(Invitrogen社)を使用し増幅したcDNA断片をプラスミドベクターにクローニングした。得られた遺伝子断片の塩基配列を決定した結果、既知のカテプシンDの塩基配列と同一であることが確認できた。しかし、PACE4をカテプシンD前駆体と同定した場合、非活性型である前駆体がなぜ例えばプラスミノゲンを切断できるのか、あるいは元来細胞内酵素であるカテプシンがなぜ細胞外に放出されるのか、という疑問が生じる。本願発明の酵素が真にカテプシンD前駆体と同一であるか否かという点については全アミノ酸配列、構造が明らかにされることが必要である。しかし、現時点においてカテプシンD前駆体、活性型カテプシンD共に本願発明の酵素活性を有するものであり、いずれもPACE

4 の範疇に入る。また、同様に欠失、置換または化学修飾されたカテプシンD誘導体も、使用目的が癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片を調製する目的であれば、本願発明の酵素の範疇に入るものである。

【0023】

PACE 4 で切断した蛋白断片の調製法

プラスミノーゲンを PACE 4 と一定割合で混合し pH4.0 の条件下で反応させる。中性域の緩衝液で透析後、反応液をリジンセファロースに吸着させてリジン結合の有無により分離することによって、プラスミノーゲンのクリンゲル 1 ~ 4 を含む画分を調製することができる。本断片は炭酸アンモニウム緩衝液で透析後、凍結乾燥する。なお、フィブロネクチンも同様に切断し、断片混合液をヘパリンセファロースで分離することによって所望の断片を調製することができる。

【0024】

PACE 4 の使用方法

1. PACE 4 で切断した蛋白断片を転移増殖巣増殖抑制剤として使用する方
法 上述の方法で調製した蛋白断片を生理食塩液で溶解し、これを動物試験の試料とした。転移増殖巣増殖抑制効果を判定する系としては、マウスに転移増殖性癌を移植し、遠隔転移増殖巣の状況を把握する系を用いた。マウスの背部皮下に肺癌細胞(LL/2; 大日本製薬)を移植し、原発巣が所定の大きさになるまで飼育した後、原発巣を術的に取り除き、1 mg/匹/日でマウス腹腔に試料を10日間投与した。なお、対象は凍結乾燥試料を溶解する際に用いた生理食塩水を同量投与するものとした(転移増殖巣増殖抑制試験)。

転移増殖抑制試験の場合には原発巣除去後、さらに一定期間飼育した後、1 mg/匹/日でマウス腹腔に試料を10日間投与した。

各試験終了後、マウスを解剖し転移増殖抑制試験の場合は肺表面の結節数を、転移増殖巣増殖抑制試験の場合は肺重量を測定し、対照群と比較した(Mann Whitney U検定)。転移増殖抑制試験の結果、対照群の転移増殖結節数が 6.3 ± 0.2 g (n=6) であるのに対して、プラスミノーゲン断片投与群の転移増殖結節数は 2.1 ± 0.8 g (n=6) であり、プラスミノーゲン断片の投与により癌転移増殖を抑制していることが判明した。また、転移増殖巣増殖抑制試験では対照群の

肺重量が 0.44 ± 0.28 g ($n=6$)であるのに対して、プラスミノゲン断片投与群の肺重量は 0.23 ± 0.08 g ($n=6$)であり、プラスミノゲン断片投与群が有意にLL/2の肺転移増殖後の増殖を抑制することが認められた。

【0025】

以上の結果は、転移増殖の抑制と血管新生の阻害による結果と推察され、とりわけ転移増殖の抑制については、当該断片によるマトリックス分解酵素活性化の阻害、プラスミンの競合阻害によるプラスミン作用の抑制、およびレセプターを介したマトリックス分解酵素のダウンレギュレーションなど直接的、間接的に転移増殖を抑制した結果と考えられる。一方、血管新生の効果については本願発明の酵素が断片化するプラスミノゲン断片がO'Reilly等の報告したアンジオスタチン及びプラスミノゲンのクリングルと同等の活性を発現した結果と考えられる。しかし、ウシ大動脈血管内皮細胞を用いた内皮細胞の増殖抑制試験においてはその増殖を抑制する結果は得られてはならず、転移増殖巣の増殖抑制の機序については、現時点では不明である。

【0026】

2. PACE4を転移増殖巣増殖抑制剤として使用する方法

調製したPACE4自体の転移増殖巣増殖効果を判定する系としては、免疫不全(Scid)マウスを用いた系を使用した。すなわち、Scidマウスの背部皮下に肺癌細胞(3LL; 東北大学加齢医学研究所 医用細胞資源センターより供与)を移植し、原発巣が所定の大きさになるまで飼育した。また、マウスに病態の状況を反映させるため、原発巣の大きさによって、全群を原発巣重量1200 mg以下群と1200 mg以上群とに分けた。各群の原発巣を術的に除去した後、さらに各群を3群に分け、PACE4の高濃度投与群、低濃度投与群、対照群とし、 $40 \mu\text{g}/\text{匹}/\text{日}$ あるいは $8 \mu\text{g}/\text{匹}/\text{日}$ でマウス腹腔に試料を10日間投与した。なお、対照は凍結乾燥試料を溶解する際に用いた生理食塩水を同量投与するものとした。

試験終了後マウスを解剖し肺重量を測定し対照群と比較した(Mann Whetney U検定)。その結果、興味深いことに原発巣1200 mg以上群(図中B)において、本願発明の酵素による転移増殖巣増殖抑制活性が濃度依存的に認められた(図

9)。

【0027】

上述の結果は極めて興味深い知見である。すなわち、カテプシンD様の本願発明の酵素が生体内で作用するということは、少なくともpH5.0という低pH環境が生体内に存在することを意味するからである。このpH5.0以下という環境は非生理的であり、この酵素が生理的にどのように作用しているのかは現段階では不明であるが、担癌環境がこの低pH環境を生み出しているとする報告もある。Briozzo等は、本願発明の酵素と同種類に分類されるアスパラギン酸酵素であるカテプシンDが癌細胞から分泌され、遠隔部位で作用し、細胞外マトリックスを分解することを示している(Briozzo P et al., Cancer Res., vol.48, p.3688-3692, (1988))。このことは、間質にアスパラギン酸プロテアーゼが作用できるpH5.5以下のpH域が存在することを示すものである。特に、この低いpHは細胞外マトリックスに近接した悪性腫瘍によって生じた微小環境で認められる。これらのメカニズムに関しては、膜癌蛋白からのプロトンの遊離の増加、またはH-ATPase (Baron R. et al., J. Cell Biol., vol.101, p.2210-2222, (1995))、もしくは癌細胞のオリゴサッカライド鎖のシアル酸含量が増加することが原因で(van Beek W.P., et al., Cancer Res., vol.33, p.2913-2922, (1973))、細胞膜での酸性側への局在化(Carrel A, et al., J. Exp. Med., vol.144, p.503-521, (1976))に起因するものと考えられる。また、癌の酸性化は無酸素状態の結果であることは従来から提唱されている(Spechler S. J., et al., Arch. Int. Med., vol.138, p.1663-1664, (1978))。カテプシンDも本願発明の酵素も膜結合能を有する性質から細胞外へ放出される際は膜に包み込まれた状態であることが推察される。カテプシンD等の細胞内プロテアーゼは主にエンドソーム、リソソームと呼ばれる膜胞に局在する。両膜胞はH-ATPaseの分布により極度に酸性側に傾いており、細胞内外の異物を分解、再利用を果たす役割を有している。癌細胞に何らかの条件が加わることによりこの膜胞が細胞外に放出され、膜胞付近に存在するプラ

スミノーゲンあるいは細胞外マトリックスを細胞外で消化することも推察される。

【0028】

3. PACE 4によるフィブロネクチン等血漿蛋白の分解

本願発明者は、癌状態で多く産生され細胞接着に深く関与する血漿成分であるフィブロネクチンに注目し、これを本願発明の酵素で切断した。フィブロネクチンは当該酵素によって限定的に分解され、かつその分解産物にはインタクトの状態では認められない強力なBCE血管増殖抑制能力が認められた。当該酵素によるフィブロネクチン分解産物をさらにヘパリンセファロース(ファルマシア社)で分離した画分を上述のマウスを用いたモデル系に投与した結果(1mg/kg/day)、これらの断片に転移増殖巣の増殖抑制効果が認められた。本成績は転移増殖巣の増殖を抑制する断片はプラスミノーゲンに限らないことを示すものであり、その仮定を証明するため、本願発明者は、マトリックス構成成分であるテトラネクチンまたはプラスミノーゲンが有するのと同様なクリングル部を有する血漿蛋白に本願発明の酵素を作用させ、上述の血管内皮細胞の系でその血管新生阻害活性を評価した。

また、本願発明者は、血漿蛋白をアルコール分画して得られる幾種かのフラクションを同様に本願発明の酵素で切断した。アルコール画分から透析によってアルコールを除いた後、さらにクエン酸リン酸緩衝液(pH4.0)で透析し、蛋白量対酵素比を100:1の割合で当該酵素を混合し、37℃で一晩反応させた。なお、同蛋白粗液はpH4.0の条件で多くの沈殿を生じるため、酵素反応の前には6000rpm(トミー社製)で遠心処理をし、その上清を使用した。反応液はさらに50mMTris/50mMNaCl(pH7.2)の緩衝液で一晩透析後、0.45 μ mのフィルター(Millex HA:ミリポア社製)で濾過後、ヘパリンセファロース(Hi-trap Heparin:ファルマシア社製)5mlによって蛋白混合液を得た。現段階では活性のみであるが、本願発明者は既に、アルコール画分のうちフラクションIIIまたはフラクションIVを切断し、このうちヘパリン担体に結合する画分に血管内皮細胞の増殖を抑制する活性を認めている。

【0029】

4. 癌患者血漿中のP A C E 4の測定

癌患者血漿中のP A C E 4の活性は、P C-3培養上清中のP A C E 4活性を測定する方法に基づいて測定した。披検試料を測定するに当たり、各種癌細胞の培養上清中に放出される酵素活性を上述のプラスミノゲン分解活性で検討した結果、P A C E 4は正常細胞では殆ど細胞外へ放出されることがなく、ある種の癌細胞で多量に放出されるのが特徴であることが見出された(図10)。図10中で、A)はS D S-P A G E、B)は抗プラスミノゲン抗体を用いたウェスタンブロット、C)はP A C E 4の阻害剤と共に反応させた際のS D S-P A G E、D)はシステイン酵素阻害剤と共に反応させた際のS D S-P A G Eを示す。また、P L Gはプラスミノゲン(対照)、N K L Fは平滑筋細胞、H U V E Cは血管内皮細胞、P C-3は前立腺癌細胞、H e p G 2は肝癌細胞、C O L O Nは大腸癌細胞、M C F 7は乳癌細胞、L L/2はマウス肺癌細胞の例示を意味する。P A C E 4活性は正常細胞では認められず、前立腺癌、大腸癌、肺癌細胞で大量に産生されていることが判明した。また、肝癌細胞はP A C E 4とは異なるアスパラギン酸酵素が存在していることが判明した。また、乳癌細胞にP A C E 4活性は認められなかった。

上記の知見は、本酵素活性の測定が癌状態を把握するうえで重要なマーカーとなる可能性を強く示唆している。本願発明者等は癌患者血漿のP A C E 4活性をP A C E 4スクリーニング系に適應させ、その活性値を測定した。癌患者血漿中の当該酵素活性は $0.73 \pm 0.6 \text{ unit (n=30)}$ であり、健常人の $0.02 \pm 0.1 \text{ unit (n=6)}$ に比較して有意に高値であることが判明した。

【0030】

上述の方法で調製された酵素あるいは当該酵素によって断片化された抗癌能力を有する蛋白断片は、その活性を最大限に維持するためには、新鮮状態で使用するか、保存する場合は4℃で保存し保存後7日以内に使用することが望ましい。あるいは、これらをヒトアルブミン、ゼラチン、塩、糖またはアミノ酸等の好適な安定剤と共に凍結乾燥もしくは液状の状態で保存することができるし、さらには凍結し保存することも可能である。また、感染性夾雑ウイルスの不活性化を目的として、凍結乾燥状態において所定の条件下、例えば65℃96時間加熱処理

を施すことは、薬剤の安全性の観点から好ましい態様である。本願発明では、かかる有効成分としてのPACE4または当該酵素によって調製される抗癌能力を持つ蛋白断片を公知の適当な賦型剤と組み合わせ、公知の方法で本願発明の癌転移増殖抑制剤とすることができる。

本願発明のPACE4またはPACE4によって調製される血漿蛋白断片を本態とする癌転移増殖抑制剤の有効投与量は、例えば投与対象者の年齢、症状及び重症度等により変動し、最終的には医師の意図により変動するものであるが、例えば一般に成人一人当たり30～150mg程度を1～2回に分けて投与することなどが想定される。投与方法は単回大量(ボラス)あるいは静脈点滴投与が最適である。また、場合により他の抗癌剤と併用することも可能であり、本願発明によって提供される癌転移増殖抑制剤中に前記の抗癌剤を併存させることも好ましい態様の一つである。

なお、本願明細書中の実施例で使用した血液由来のプラスミノゲン断片に関しては、マウスでの単回静脈投与毒性試験、呼吸器循環器系に及ぼす影響をビーグル犬を用いて実施する一般薬理試験及びウイルス不活性化試験等によりその安全性が確認されている。

【0031】

本願発明の効果

本願発明の血漿蛋白断片化酵素または当該血漿蛋白断片化酵素によって調製される血漿蛋白断片を主成分とする癌転移増殖抑制剤は、肺癌、大腸癌に代表される固形癌等の臨床治療に利用され得る。

ヒトプラスミノゲンをエラスターゼで処理することによって得られるヒトアンジオスタチンは、強力に血管内皮細胞の増殖を抑制し、新生血管に依存する主要の増殖を有効に抑制することがO'Reilly等の報告で明らかにされている(O'Reilly et al., Nat. Med., vol. 2, p. 689-692, (1996))。血管新生阻害剤による癌治療は従来の化学療法に比較して副作用が少なく、且つ薬剤耐性を受けにくい点で大きな注目を集めている。しかし、一方で血管新生阻害剤は癌が存在する間その投与が続けられる必要があり、特にアンジオスタチンのような蛋白由来物質については、その供給が大きな問題とな

る。遺伝子組換え技術を用いたアンジオスタチンの調製あるいは癌患者へのアンジオスタチン遺伝子の導入などは、これら問題の解決手段として注目されているが、PACE4の癌患者への導入もこの問題の解決策または治療法の一つとなり得る。

即ち、1.アンジオスタチンの原料であるプラスミノーゲン は生体内に大量に存在するため、本願発明の酵素は少量で有効にプラスミノーゲンからアンジオスタチンを調製することが可能である。2.アンジオスタチンを産生させると共に、癌進展に促進的に作用するプラスミンを不活性化させることにより、より有効にアンジオスタチンの活性を発現させることができる。3.本願発明の酵素は外分泌系(胃)を除く中性のpHに保たれた生体内では作用せず、その作用はPACE4がその活性を発現する低いpH域を有する癌周辺に限局されるため有効であり、かつ安全である。また、4.本願発明の酵素はプラスミノーゲンに限らず、フィブロネクチンあるいはテトラネクチンを切断し血管新生阻害作用を有する断片を遊離させるため、5.その相乗的作用によってより有効に血管新生に依存する癌の転移増殖を抑制することができる。

【0032】

以下、本願発明の理解を深めるために実施例に沿って説明するが、本願発明はこれらの実施例になんら限定されるものではない。

【0033】

実施例 1

(酵素原液の調製)

ヒト前立腺癌細胞(PC-3)は九州大学医学部、桑野伸信教授より供与された。PC-3は10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI-1640培地(日水製薬社製)で維持し、コンフルな状態になった時点で、その培地をFCSを含まないRPMI-1640(以下、無血清培地)に置換し、1~2日間培養後、その培養上清を回収し、遠心(3000rpm×20分間)、濾過(0.45μm Millex HA:ミリポア社製)処理したものを酵素原液とした。

【0034】

実施例 2

(酵素活性の確認)

酵素原液の活性は、Gately等の方法に従い、酵素原液とプラスミノゲンとを反応させ、その反応液をSDS-PAGEで分離後、抗LB SI抗体を用いたイムノプロットでプラスミノゲンが分解されている度合いを確認することによって評価した。

【0035】

実施例3

(培養上清のプラスミノゲン断片化に対するpHの影響)

実施例1の培養上清100 μ l、1mg/mlのプラスミノゲン溶液100 μ l、及び各種pH緩衝液を1:1:2の割合で混合し、37℃でインキュベーションし、酵素活性を実施例2に記載の方法で確認した。結果を図1に示した。図で明らかなようにpH5.0を境にプラスミノゲンの断片化様式に差が認められた。矢印(→)はGately等が報告したPACE由来のプラスミノゲン断片に相当する。

【0036】

実施例4

(PACE4により生ずるプラスミノゲン断片の同定)

実施例3に記載の検体のうちpH4.0に相当する反応液について12.5%のSDS-PAGEを実施し、常法に従い、蛋白をイモビロン膜(ミリポア社製)に転写した。これにウサギ抗ヒトプラスミノゲンLysine Binding Site I抗体、ウサギ抗ヒトプラスミノゲンミニプラスミノゲン抗体を用いてイムノプロットを行った結果を図11に示した。図のように非還元型の泳動で3本のバンドが認められ、このうち40、43kDaのバンドはウサギ抗ヒトプラスミノゲンLysine Binding Site I抗体に35kDaのバンドはウサギ抗ヒトプラスミノゲンミニプラスミノゲン抗体にのみ反応した。図中、aはリジンセファロース結合画分、bはリジンセファロース素通り画分である。

【0037】

実施例5

(pH4.0条件での切断様式)

実施例3の条件でプラスミノゲンを断片化した検体を12.5% SDS-PAGE電気泳動を実施し、常法に従い、蛋白をイモビロン膜(ミリポア社製)にトランスブロットした。その後、アミドブラックで染色後、精製水で脱色し、約40、43 kDaのバンドと35 kDa付近のバンドをそれぞれ取り出した。各バンドについて、アミノ酸N末分析機(BioApplied 社製)によってそのアミノ末端アミノ酸残基を求めた。得られた蛋白質のN末端アミノ酸残基は40、43 kDaのバンドは79 Leuであり、35 kDaに相当する部分は480 Proであった。pH4.0条件で切断される本断片はその分子量からクリングル1~4を含む断片であることが推察された。本断片を以下PAN4 (PACE derived Angiostatin pH4.0)と略称する。

【0038】

実施例6

(各種癌細胞のPACE4の産生)

実施例1のPC-3の代わりにヒト繊維芽細胞、ヒト臍帯血由来血管内皮細胞、ウシ大動脈血管内皮細胞、ヒト肝癌細胞(He p G 2)、マウス肺癌細胞(LL/2)の培養上清を用い実施例3の方法に従いプラスミノゲンの断片化を調べた。PC-3培養上清以外の癌細胞にも同様の断片化酵素が認められた。

【0039】

実施例7

(PACE4のスクリーニング系)

PACE4のスクリーニング法の概念を図2に示した。固相抗体として抗ミニプラスミノゲン抗体を用い、標識抗体としてプラスミノゲンのクリングル1~3に反応する抗体を用い、既知量のプラスミノゲンと試料を反応させた液をこの測定系に加える。クリングル4からミニプラスミノゲン間で切断があった場合、その発色値はその程度に従って低下する。この低下の率を評価することによって酵素量を決定する。

1) 試料の調製

750 μ lの0.1Mリン酸/クエン酸緩衝液(pH3.0)に200 μ lの検体(培養上清または精製中間原料)を加え、これに最終濃度20 μ g/mlのプラスミノ

ゲンまたはLysプラスミノーゲン50 μ lを添加し、37℃で1時間反応させた。反応液は、20 U/mlアプロチニン、1% BSAを含むリン酸緩衝液で希釈し、これをELISAの試料とした。

【0040】

2) ELISAの操作

リン酸緩衝液からなる抗体希釈液に抗ヒトLBSI抗体を20 μ g/mlになるように溶解し、これを96ウエルマイクロタイタープレート(IMMUNO MODULE MAX ISORP F8、ヌンク社製)に1ウエルあたり100 μ lずつ添加し4℃で一晩放置した。各ウエルより上記抗体液をマイクロタイタープレート洗浄機(DIATECH社製、ULTRA WASH II)で吸引除去し、PBSで洗浄した後1%アルブミン(Albumin Fraction V, Bovine、生化学工業社製)溶解液を300 μ l添加し、4℃で一晩放置した。アルブミン溶液を吸引除去し、前記緩衝液で3回洗浄し測定用ウエルとした。別に、ペルオキシダーゼ標識した抗mPlg.抗体を0.05%のTween 20を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で希釈した溶液(20 ng HRP conjugate/ml)を準備した。測定用ウエルに上記の方法で調製した試料を1ウエルあたり100 μ l入れ、37℃で1時間放置し反応させた。各ウエル中の反応液を吸引除去し、0.05%のTween 20を含むPBS(pH 7.2)で4回洗浄後、ペルオキシダーゼで標識した抗mPlg.抗体溶解液を100 μ l入れ、37℃で30分間放置し反応させた。各ウエルの反応液を吸引除去し、0.05%のTween 20を含むリン酸緩衝液(pH 7.2)で4回洗浄後、基質液(OPD/H₂O₂)100 μ lを各ウエルに添加後20分間室温遮光下で放置した後、2N硫酸を各ウエルに100 μ lずつ加え反応を停止した後、プレートリーダー(WAKO Molecular Devices, THRM0 max microplate reader)で490 nmの吸光度を測定した。

【0041】

(ELISAの結果)

PC-3培養上清の希釈系を本願発明の酵素測定系で測定した結果を図12に示した。図12の上図白丸は基質にプラスミノーゲンを用いたもの、黒丸はLysプラスミノーゲンを用いたものである。PC-3培養上清中のプラスミノーゲン断片化酵素は経時的に両基質を切断した。図に示されるように、反応初期にお

いて L y s プラスミノーゲンが早期に切断される傾向が認められたが、10分以降 G l u プラスミノーゲンと L y s プラスミノーゲンの切断の差は減少することが判明した。図 12 の下図はプラスミノーゲンが切断されていく様子を電気泳動図を用いて示したものである。

以上の結果は P A C E 4 は一旦ミニプラスミノーゲン部を切断した後、クリングル部を析出することを示しており、基質としては G l u、L y s のどちらのタイプのプラスミノーゲンでもその測定値は同一であることを示す。本願発明者らは便宜上、本測定系の基質を L y s プラスミノーゲンに固定し、酵素活性はこの L y s プラスミノーゲン 10 μ g を 1 分間に分解する酵素量を 1 単位として定義した。

【0042】

実施例 8

(プラスミノーゲン分解酵素の精製)

本願発明の酵素(PACE 4)は、疎水クロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィー、ゲル濾過及びハイドロキシアパタイトの各種クロマトグラフィーを組み合わせてることによって精製した。

実施例 1 の方法で得られた酵素原液 5 L を 50 mM T r i s 緩衝液(pH 7.4)で 2 倍に希釈後、50 mM T r i s / 50 mM N a C l (pH 7.4)緩衝液で平衡化した CM-S e p h a r o s e 6 B (ϕ 5x150 mm、ファルマシア社製)に通液し、さらに同緩衝液で平衡化したヘパリン-S e p h a r o s e 4 B (ϕ 2.5x100 mm、ファルマシア社製)に通液し、P A C E 4 の粗精製溶液を調製した。得られた粗精製溶液に 1 M の硫酸アンモニウムを加え一晩静置した後、4℃で 6,000 r p m の遠心処理を行いその遠心上清を得た。

遠心上清をさらに 25 μ m の孔サイズを有する濾紙(A P-25: アミコン社製)で濾過し、濾液を 1 M の硫酸アンモニウムを含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で平衡化した P h e n y l-S e p h a r o s e H i p e r f o r m a n c e (ϕ 2.5x100 mm、ファルマシア社製)で処理し、同緩衝液で洗浄後、50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で濃度勾配溶出した。その後、さらに 40% エチレングリコールを含む 50 mM リン酸緩衝液(pH 7.2)で溶出した。

活性画分(50 mMリン酸緩衝液(pH 7.2)及び40%エチレングリコールを含む同緩衝液にて溶出)を集め、同画分を大過剰の10 mM Tris緩衝液(pH 7.4)で透析した。透析後、液を50 mM Tris緩衝液(pH 7.4)で平衡化したQ-Sepharose Hi performance(ϕ 1.5x100 mm、ファルマシア社製)で処理し、1 M NaClを含む同緩衝液で濃度勾配溶出した。活性画分を集め、限外濾過膜(YM-10: アミコン社製)で濃縮後、50 mM Tris/100 mM NaCl(pH 7.4)緩衝液で平衡化したSephacryl S-200(ϕ 2.5x100 cm、ファルマシア社製)に通液しゲル濾過を実施した。分子量50,000~60,000相応付近に溶出されるピークを分取し、さらにQ-Sepharose Hi performance(ϕ 1.5x100 mm、ファルマシア社製)のクロマトグラフィーを上記の条件で実施して活性画分を調製した。得られた活性画分は最終的に20 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)で透析した後、同緩衝液で平衡化したハイドロキシアパタイト(ϕ 2.5x100 mm、バイオラッド社製)に通液し、200 mMリン酸緩衝液(pH 7.4)の濃度勾配溶出を用いて精製した。精製した蛋白質は分子量が42~45 kDa(還元型)に相当するバンドとして認められた。精製後のSDS-PAGEを図4に示した。PACE 4は分子量42~45 kDa(還元型: 試料をメルカプトエタノールで処理したもの)の蛋白質として認められた。

【0043】

(PACE 4のN末端アミノ酸残基の分析および同定)

PC-3培養上清より調製した本願発明の酵素はGVDF膜(イモビロン、ミリポア社製)にトランスブロットしたものをアミノ酸シーケンサー(Applied Biosystem Model 477A protein sequencer)で分析した。当該酵素のN末端アミノ酸分析の結果はLVRIPLHKFTでありホモロジー検索の結果、ヒトカタレプシンD前駆体(Human Cathepsin D precursor)のそれと一致した。

【0044】

実施例9

(本願発明の酵素によるプラスミノゲン断片の調製)

本願発明の酵素によるプラスミノゲン断片の調製は、Lysプラスミノゲ

ンと本願酵素をインキュベーションした後、反応液をリジンアフィニティークロマトグラフィーで分離することによって調製した。50mM Tris/0.15M NaCl (pH 8.0) からなる緩衝液中に Lys プラスミノーゲンと本願酵素が 100:1 の割合になるように混合した後、37℃で3時間反応させた。反応液は同緩衝液で平衡化した Lysine Sepharose 4B (φ10×15mm) に通液し、洗浄後、0.1M イプシロンアミノカプロン酸を含む同緩衝液で溶出した。また、プラスミノーゲンをを用いた場合の断片の調製に関しては、37℃で一晩反応させ、以下同様に操作した。得られた画分は0.1M炭酸アンモニウムで透析した後凍結乾燥し、使用時まで-80℃で保存した。

【0045】

実施例10

(本願発明の酵素によって生成したプラスミノーゲン断片)

本願発明の酵素により生成したプラスミノーゲンクリングル1～4を含むプラスミノーゲン断片を12.5%のSDSポリアクリルアミドで電気泳動し、クマシー染色した結果を図13に示した。2-メルカプトエタノールで処理した(還元型)プラスミノーゲン断片について、55kDaと63kDaの分子量に相当する2本のバンドが認められた。また、2-メルカプトエタノールで処理していない(非還元型)プラスミノーゲン断片は還元型の分子種に相当する40kDaと43kDaにわたる2本のバンドが認められた。

【0046】

得られたプラスミノーゲン断片について、そのN末端アミノ酸残基を分析した。Lys プラスミノーゲンを基質とした場合およびプラスミノーゲンを基質とした場合のN末端アミノ酸残基はともに77Lysであった。

【0047】

実施例11

(免疫不全動物を用いたPACE4の抗癌増殖抑制作用)

1. 癌細胞

ルイス肺癌細胞(LL/2)は大日本製薬より購入し、ルイス肺癌細胞(3LL)は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより分与を受けた。各細胞は1

0%FBSを含むRPMI-1640/HighGlucose培地(大日本製薬社製)で、37℃、5%CO₂条件下で維持、培養した。

2.マウス

6週齢のC57B1マウスは九州動物より購入し、免疫不全(Scid)マウスはチャールズリバー社より購入した。各動物とも、4~5匹/ケージで1週間、無菌施設で馴化し飼育した後に実験に供した。

【0048】

6週齢の免疫不全マウスにルイス肺癌細胞(LL/2)を 10^6 cells背部皮下に移植し、14~17日間飼育して形成される背部の癌(原発巣)を術的に切除し、その原発巣の大きさを基に2群に分類した。原発巣1200mg以下群(原発巣200mg~1200mg)と1200mg以上群(原発巣1201mg~2500mg)をそれぞれ3群に分け、本願発明酵素(PACE4)高投与群、本願発明酵素(PACE4)低投与群及び対照群とした。術後4日飼育後、各々の群に対してPACE4を10 μ g/匹、2 μ g/匹及び生理食塩水100 μ lで毎日10日間腹腔内投与を行った。その後マウスを解剖して肺の重量を測定した。結果を図9に示した。図中、Aは原発巣重量1200mg以下群へのPACE4投与を、Bは原発巣1200mg以上群への投与を示す。なお、点線は正常マウスの肺重量を示す。図のように1200mg以下群においては肺重量で対照群との差異を認めなかったが、1200mg以上群ではPACE4投与の量依存的な肺重量の抑制(転移増殖巣の増殖抑制)作用が認められた。

【0049】

実施例12

(PACE4で切断したプラスミノゲン断片の担癌動物への投与)

6週齢のC57B1マウスの背部皮下にルイス肺癌(LL/2)細胞を 10^6 cells移植し、14~17日間飼育し、背部の癌(原発巣)が300~1200mgに達した時点で原発巣を術的に切除し、消毒後患部を縫合した。さらにマウスを14日間飼育した後、10日間PACE4で切断したプラスミノゲン断片を25 μ g/匹で腹腔内投与した。11日目にマウスを解剖して肺を摘出し、肺の重量を測定した。対照群の肺重量が 0.44 ± 0.28 g(n=6)であるのに対して、

プラスミノゲン断片投与群の肺重量は 0.23 ± 0.08 g ($n=6$)であり、プラスミノゲン断片投与群が有意にLL/2細胞の肺転移増殖後の増殖を抑制することが認められた。

【0050】

実施例13

(血管内皮細胞増殖阻害試験)

血管内皮細胞増殖抑制試験はGately等の方法に従いヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC; Human Umbilical vein endothelial (HUV) cell、三光純薬)を用いた系で評価した。HUVECは24ウエルプレート(Nuncclone, Nunc社製)に12,500細胞/ウエルで播種し、キットに添付の培養液で一晩培養した後、1,10,50,100 μ g/mlの当該プラスミノゲン断片(対照としては生理食塩液)を加え、5%CO₂条件下、72時間、37℃で培養した。トリプシン/EDTA溶液で細胞をウエルから剥離させ、コールターカウンター(コールター社製)で細胞数を計測した。

また、同様にO'Reilly等の方法に従いウシ大動脈血管内皮細胞を用いた系によっても当該プラスミノゲン断片を評価した。ウシ大動脈血管内皮細胞(Bovine aorta endothelial (BAE) cell)は三晃純薬より購入したものを、ゼラチンでコートした24ウエルプレート(岩城硝子社製)上で、10%ウシ胎児血清(FCS)、3 ng/ml塩基性FGF(bFGF)、1%グルタミン、1%ペニシリン、1%ストレプトマイシンを含むDMEM基礎培地中、5%CO₂の条件で維持培養を行った。24ウエルのゼラチンコートプレートにBAE細胞を12,500細胞/ウエルで播種し、bFGFを除いた基礎培地で24時間培養した後、bFGFを除いた5%FCS含有基礎培地に当該プラスミノゲン断片を100 μ g/mlになるよう希釈した培養液に交換し、20分間37℃で反応させた。ここで、陰性コントロールとして生理食塩液を、陽性コントロールとしてアンジオスタチン(Angiostatin、テクノクロン社製)を用いた。反応後、5%FCS、2 ng/ml bFGFを含む基礎培地を加え、37℃で72時間さらに培養した。トリプシン/EDTA溶液で細胞をウエルから剥離させ、コールターカウンター(コールター社製)で細胞数を計測した。

【0051】

(PACE 4 によって調製されたプラスミノゲン断片の血管内皮細胞増殖抑制作用)

PACE 4 によって調製されたプラスミノゲン断片を $0 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ で上述の血管内皮細胞に作用させたが、当該断片に血管内皮細胞の増殖を抑制する作用は認められなかった。一方、テクノクロン社より購入したアンジオスタチンにはその増殖を抑制する作用が認められた。

【0052】

実施例 14

(PACE 4 の E. coli. による発現(cDNA 調製))

PACE 4 の N 末端分析の結果は実施例 8 に示したように、lysosome 系の蛋白分解酵素であるカテプシン D の前駆体のアミノ酸配列と相同性が高く、カテプシン D 自体にも PACE 4 と同様の活性が認められたことから、PACE 4 の活性の本態はカテプシン D であろうと推定された。この事実から、以下の手法により PACE 4 の cDNA を単離した。

1. ヒト前立腺癌細胞 PC-3 中のメッセンジャー RNA の精製

ヒト前立腺癌細胞(PC-3)約 1600 万個から ISOGEN 液(和光純薬社製)を用い、定法に従って細胞中の全ての RNA を抽出した。この全 RNA から oligo(dT)カラムを使用して最終的に $27 \mu\text{g}$ の mRNA を精製した。精製した mRNA は、以下の cDNA 合成に使用するまで 10 倍量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の冷エタノールを加え、 -80°C に保存した。

2. cDNA 合成と増幅

精製した mRNA $1 \mu\text{g}$ から GIBCO BRL 社の SuperScript Preamplification System を使用し、その手順書に従って oligo(dT)をプライマーとして PACE 4 の cDNA を合成した。次に、データベース上に公開されたカテプシン D 前駆体 cDNA の塩基配列より、PACE 4 の遺伝子全長翻訳領域を増幅するためのセンスとアンチセンスプライマーを合成し、AmpliTaq (PERKIN ELMER 社製)を用いて所望の遺伝子の増幅を行った。

3. PACE4のcDNA塩基配列の決定

TA cloning kit (Invitrogen社)を使用し、その手順書に従って増幅したcDNA断片をプラスミドベクターにクローニングした。得られたプラスミドを鋳型として、蛍光ラベルしたジデオキシヌクレオチドを使用した。ジデオキシターミネーター法により塩基配列を決定した。決定した塩基配列とその配列により推定されるアミノ酸配列を既知のヒトカテプシンD前駆体と比較した結果、極めて相同性の高い配列であることが確認できた。

【0053】

実施例15

(癌患者血漿中のPACE4活性)

PACE4の活性測定の意義

実施例6に示したように、PACE4は正常細胞では殆どその細胞外へ放出されることがなく、ある種の癌細胞で多く放出されるのが特徴である。このことは、PACE4が癌状態を把握するうえで重要なマーカーとなる可能性を示している。前述のように、PACE4はヒトカテプシンD前駆体と極めて相同性が高く、PACE4に対する抗体はヒトカテプシンD前駆体及びその活性型であるヒトカテプシンに強く反応する。そのため、一般にヒトカテプシンに対する抗体を用いて測定された結果はPACE4にも反映させることが可能であり、癌とPACE4の関係を知るうえで重要な情報である。この関係については、乳癌を対象とした報告が最も多く、一般に乳癌状態ではヒトカテプシンDの抗原値が高く、ヒトカテプシンD量の上昇は乳癌を悪性化するというのが一般的な認識である。しかし、実施例6に示した結果は、癌の遠隔転移増殖巣の増殖を阻害する癌細胞であるルイス肺癌や前立腺癌がプラスミノーゲンを断片化するPACE4活性を細胞外に多く放出するのに対して、乳癌細胞(MFC-7)にはその活性が殆どないことを示すものであり、乳癌においてはその抗原値とPACE4活性値に大きな差異が認められることが類推された。

PACE4の活性は断片化したプラスミノーゲン量をELISAで測定するものであり、カテプシンDで用いられるヘモグロビンの切断断片の色素を吸光度あるいは蛋白量で測定する方法に比べ約100～1000倍高感度である。そのた

め、血中に微量に存在するカテプシンD活性は従来の方法では測定することができない。本願発明者等は、実施例7に示したPACE4スクリーニング系を癌患者血漿のPACE4活性測定に適用し、その活性値を測定した。

【0054】

(癌患者血漿中のPACE4活性)

乳癌、肝臓癌、肺癌の各々の癌患者血漿及び正常人血漿を対象として実施例7の方法に従いそのPACE4活性を測定した。

1) 癌患者血漿の測定

マイクロ遠沈管に癌患者血漿を100 μ l、1%EDTAを含む生理食塩液100 μ l及びpH修正液100 μ lを加え37℃で一晩インキュベーションした。反応液を15,000rpmで3分間遠心処理し、上清を得、これを測定検体とした。測定検体を実施例7に示したPACE活性測定用ELISAで測定した。また、正常人血漿100 μ l、PACE4/100 μ l(0~50unit)、pH修正液100 μ lを加え37℃で一晩インキュベーションし、以下同様の操作を行い、得られる測定値で検量線を作成した。なお、本測定では血漿中に存在する内在性のプラスミノーゲンを基質として用いているため、内在量のプラスミノーゲンはプラスミノーゲン定量用ELISAを用いて測定し、一定量とした。

【0055】

2) 結果

癌患者血漿中の当該酵素活性は 0.73 ± 0.6 unit (n=30)であり、健康人の 0.02 ± 0.1 unit (n=6)に比べ有意に高値であることが認められた。癌の種類別の結果としては、乳癌 0.66 ± 0.03 unit (n=6)、肝臓癌 0.69 ± 0.03 unit (n=8)、肺癌 0.77 ± 0.04 unit (n=10)、その他 0.70 ± 0.07 unit (n=13)であり、各癌の間で測定値に差異は認められなかった。

【0056】

実施例16

(PACE4による他の血管新生抑制因子の産生)

フィブロネクチンはRouslahti等の方法(Method Enzymo

1. Vol. 82, p. 803-831)に従い、ゼラチンをリ癌ドとしたレジンをうい精製した。新鮮凍結血漿500mlを凍結融解して得られる浮遊沈殿物(クリオプレシピテート)を200mlのPBSで溶解し、同液をさらに4℃で一晩静置した。引き続き同液を10,000rpmで遠心処理し、澄明感のある沈殿物を得た。沈殿物を室温でPBSで溶解後、ゼラチンSephacryl 4Bに通液し、十分に洗浄した後、4M尿素を含むPBSで溶出した。得られたフィブロネクチンはさらにSepacryl HR500(ファルマシア社製)でゲル濾過を行った後、SDS-PAGEでその純度を確認し、使用時まで-80℃で保存した。ヒトロネクチン、ヒト肝臓細胞増殖因子(HGF)はベクトンディッキンソン社及びカルбиоケム社より購入した。

上述の蛋白質を0.1Mリン酸-クエン酸緩衝液とし、pHを4.0に調整後、PACE4と蛋白質が200:1になるように本願発明の酵素を加え37℃で一晩反応させた。反応液に0.5Mのリン酸緩衝液(pH7.0)を加えて反応を停止させた後同液をPBSに透析して無菌濾過したものを検体とした。

【0057】

実施例17

(フィブロネクチンの断片化と血管新生阻害作用)

実施例13の方法で、試験検体をフィブロネクチン及びフィブロネクチン断片に換え、その血管内皮細胞増殖に関わる影響について検討した。図14に各種条件でPACE4とフィブロネクチンを接触した後の反応液の電気泳動図を示した。図中のレーン1は未処理のフィブロネクチンを、レーン2はフィブロネクチンをpH4.0の条件で12時間反応させた反応液を、レーン3はフィブロネクチンとPACE4を混合しpH4.0の条件で12時間反応させた反応液を泳動した結果を示す。また、フィブロネクチンをPACE4によって断片化した産物を血管内皮細胞に作用させた結果を図15に示した。図のようにPACE4で断片化していないフィブロネクチンが全くその増殖を抑制しないのに対し、PACE4で断片化したフィブロネクチン断片は血管内皮細胞の増殖を有意に抑制した。

【0058】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物：ヒト癌細胞

配列

Leu Val Arg Ile Pro Leu His Lys Phe Thr

1 5 10

【図面の簡単な説明】

【図1】PC-3培養上清とプラスミノーゲンを各種pHで反応させた際のプラスミノーゲンの断片化を示す図である。

【図2】プラスミノーゲン断片化酵素の測定方法の概念を示す図である。

【図3】PC-3培養上清を疎水クロマトグラフィーで処理した際の溶出パターンを示す図である。

【図4】精製したPACEのSDS-PAGEの泳動図である。

【図5】純化したPACE4を各種プロテアーゼインヒビターと反応させその阻害様式を検討した結果を示す図である。

【図6】精製したPACE4とプラスミノーゲンをpH7.0とpH4.0の条件下で反応させた際の切断様式を示す図である。

【図7】プラスミノーゲン(Glu-1)をPACE4で切断した際の経時的な切断様式を示した図である。

【図8】PACE4によるプラスミン活性の消失を示す図である。

【図9】PACE4の癌細胞転移増殖巣増殖抑制作用を示す図である。

【図10】各種癌細胞からのPACE4の産生についての検討結果を示す図である。PACE4活性をプラスミノーゲンの分解量で示した。

【図11】PC-3におけるプラスミノーゲンの分解についての検討結果を示す図であり、A)はPC-3において産生されたプラスミノーゲン断片物のSD

S-PAGEの泳動図である。B)は抗ミニプラスミノゲン抗体、抗LBS-I抗体を用いたウェスタンブロットの結果を示す図である。

【図12】 Glu-プラスミノゲンとLys-プラスミノゲンのPACE 4による切断の速度を比較した結果を示す図である。

【図13】 PACE 4によって産生されたプラスミノゲンクリングル1～4を含む断片の泳動図である。

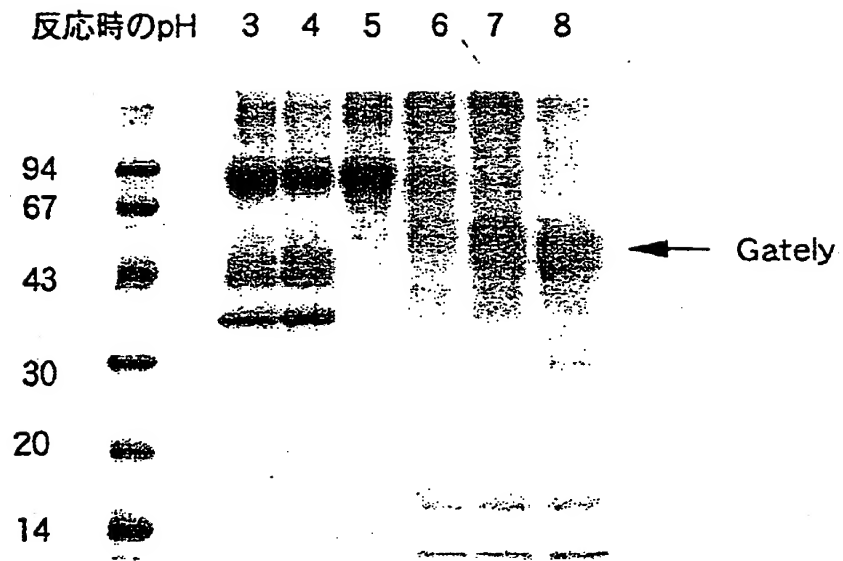
【図14】 PACE 4によるフィブロネクチンの切断に関し、各種条件でPACE 4とフィブロネクチンを接触した後の反応液の電気泳動図を示す。

【図15】 フィブロネクチンをPACE 4によって断片化した産物を血管内皮細胞に作用させた結果を示す図である。

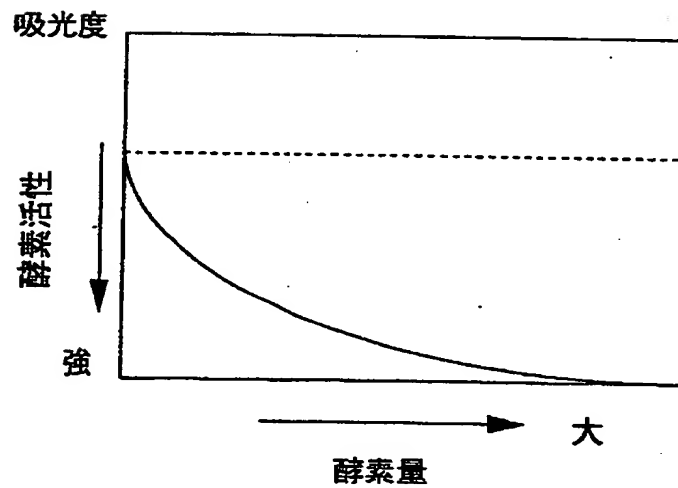
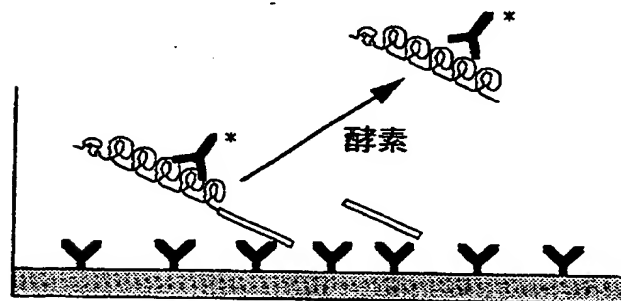
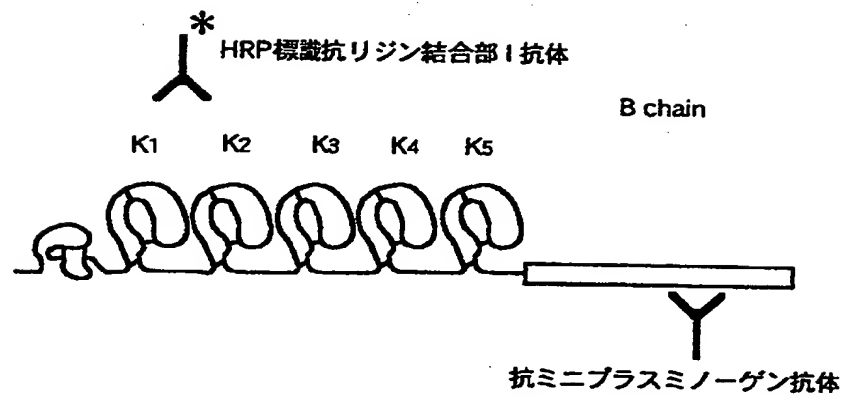
【書類名】

図面

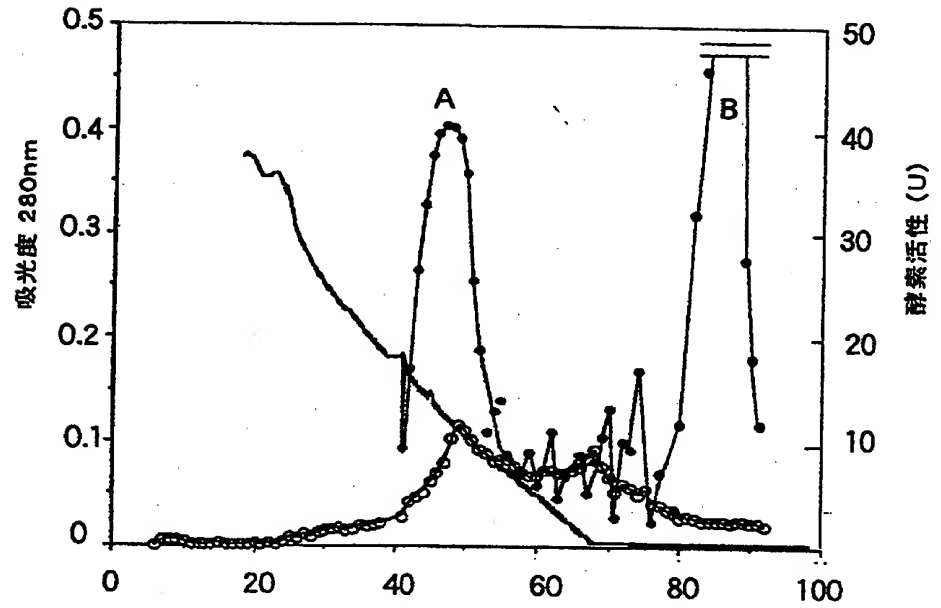
【図 1】



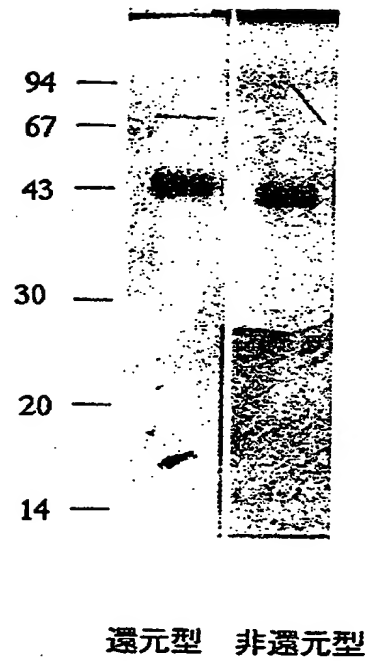
【図 2】



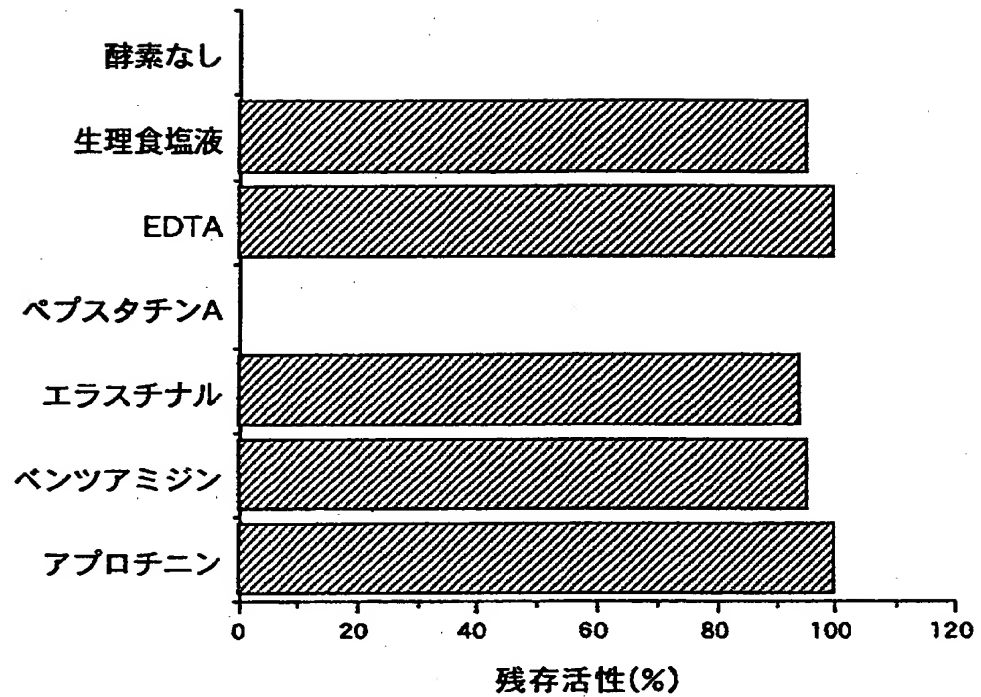
【図3】



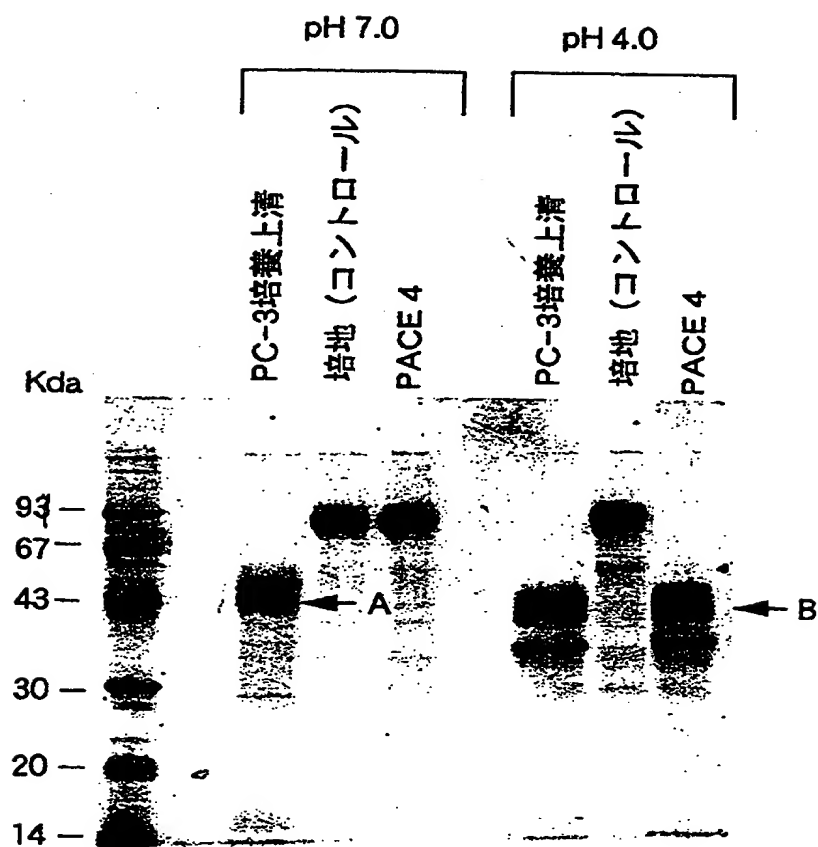
【図4】



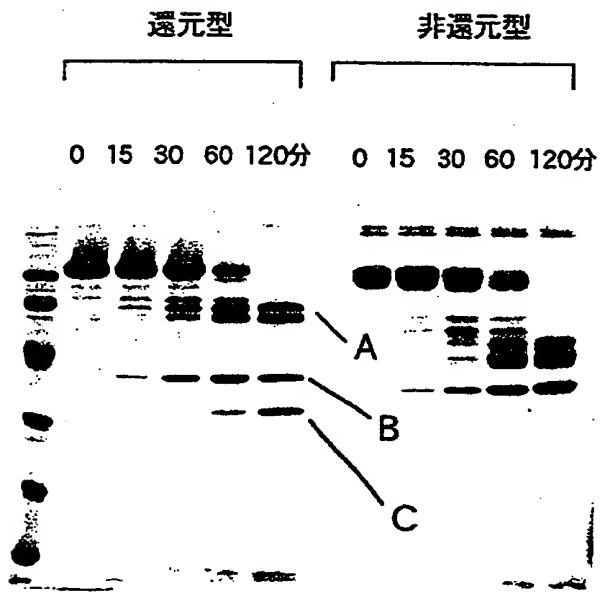
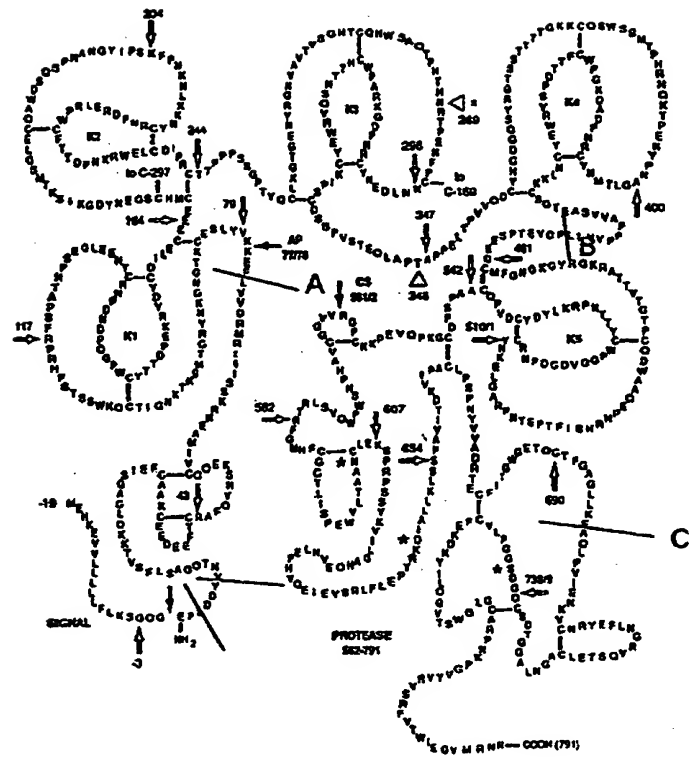
【図5】



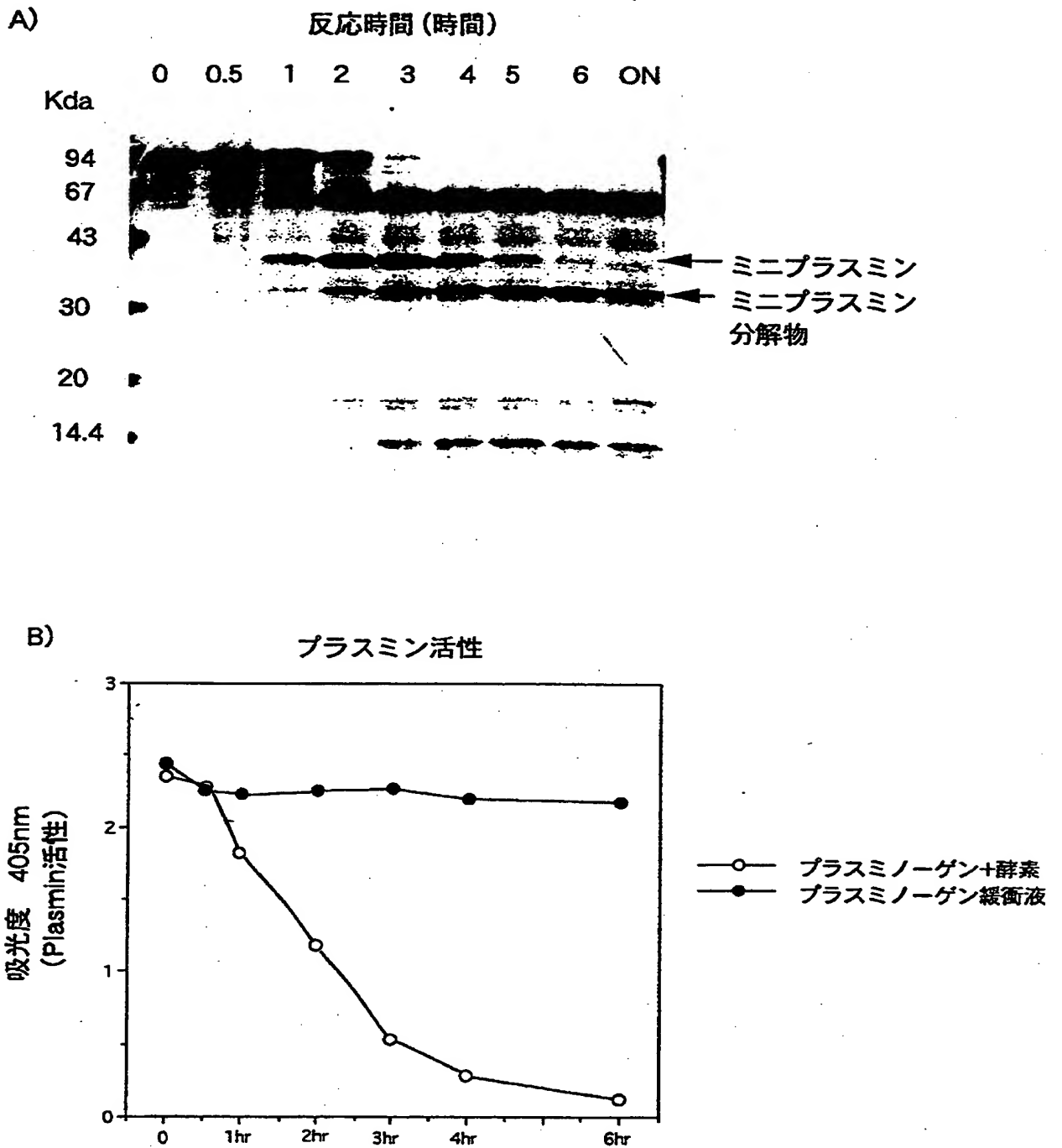
【図6】



【图7】

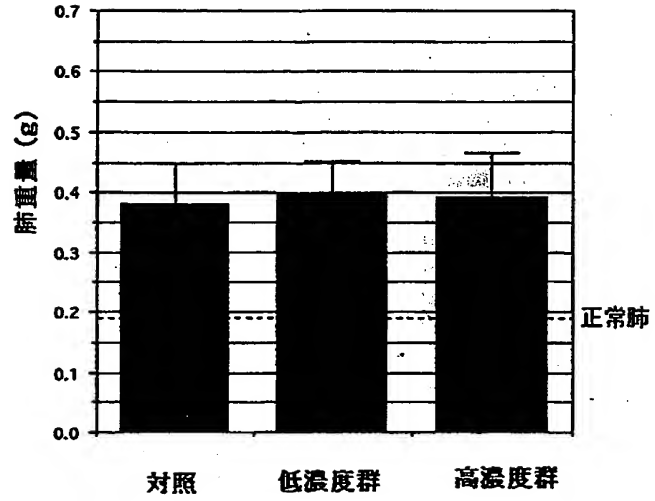


【図8】

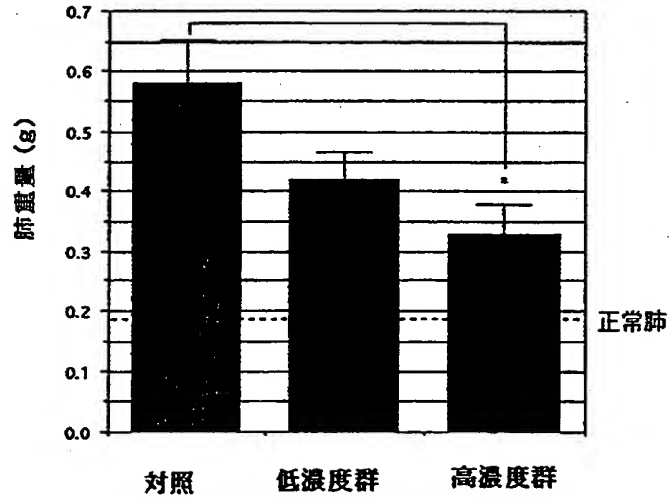


【図9】

A)



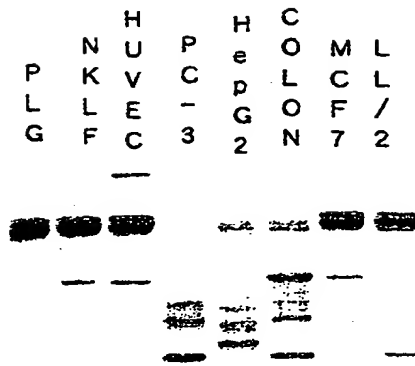
B)



【図10】

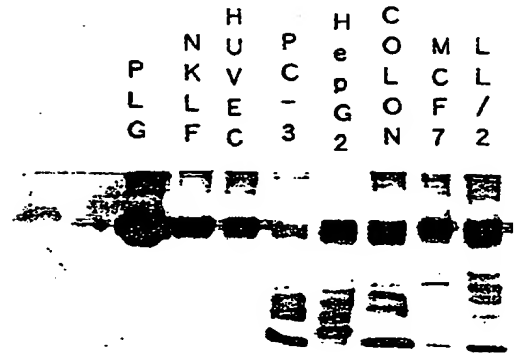
A)

SDS-PAGE



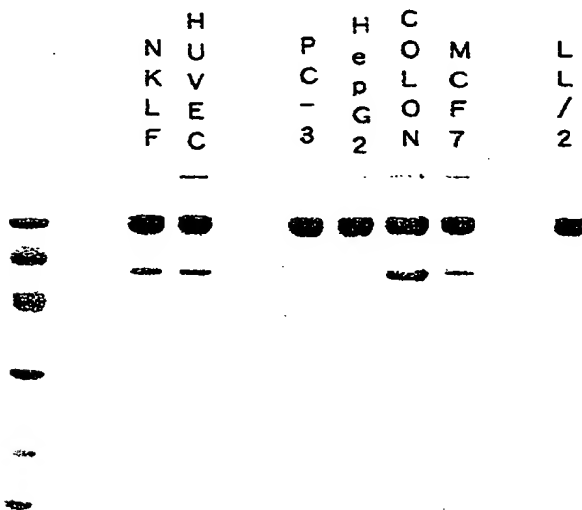
B)

抗プラスミノゲン抗体を用いた
ウエスタンブロット



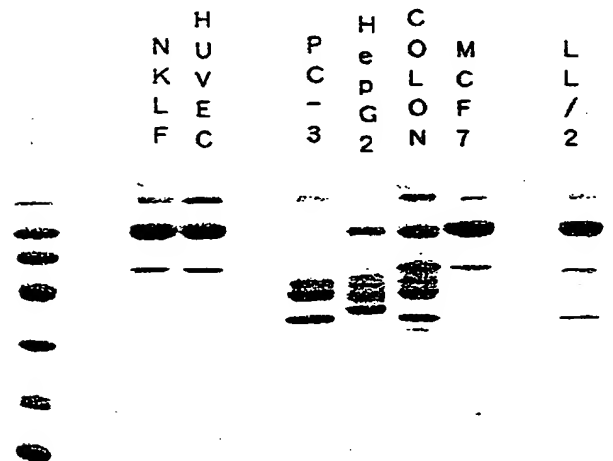
C)

ペプスタチンA(アスパラギン酸酵素阻害剤)
存在下での切断様式

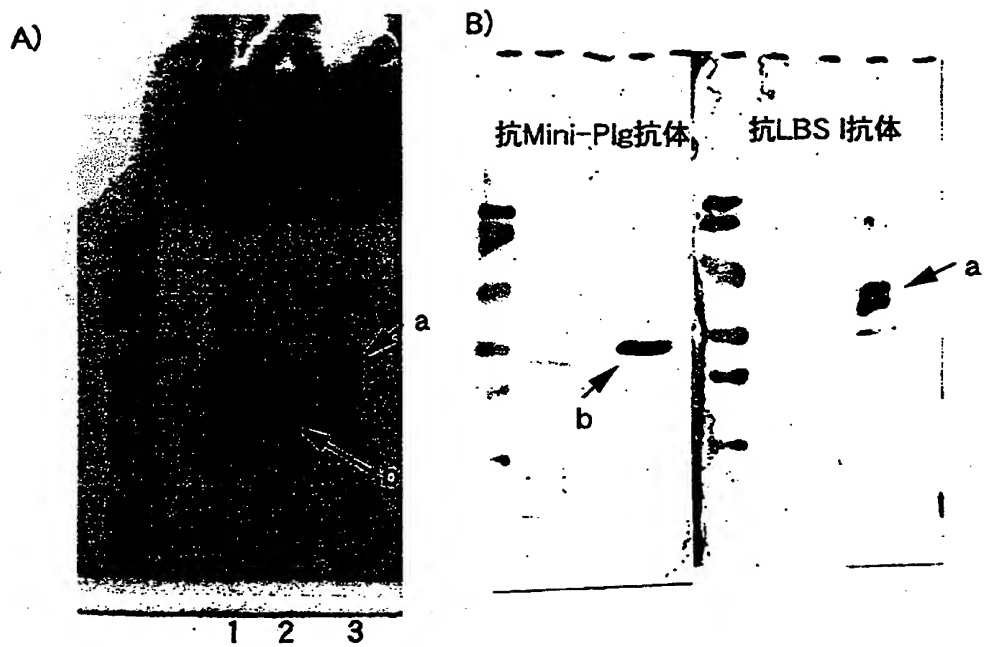


D)

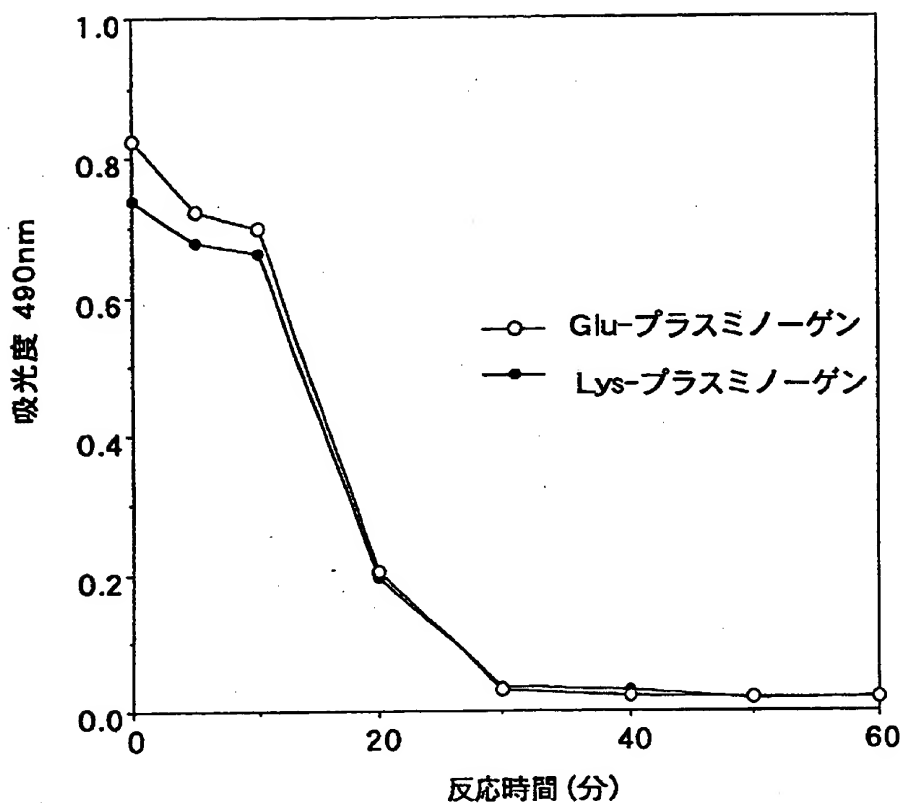
E-64(システイン酵素阻害剤)
存在下での切断様式



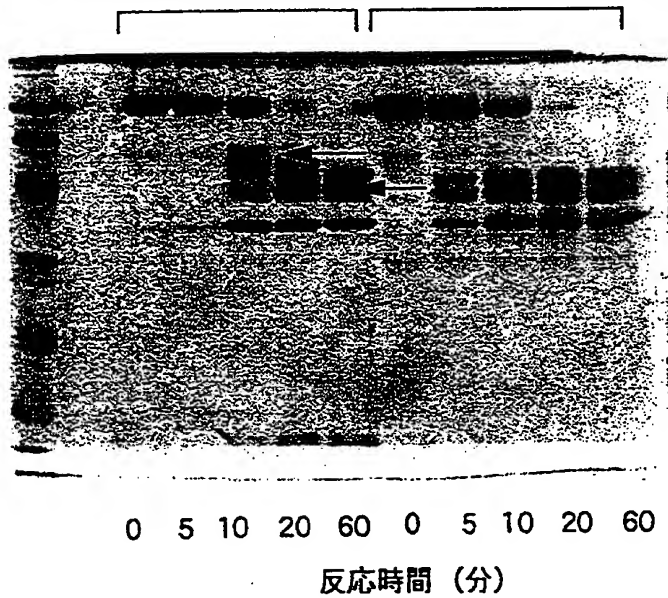
【图11】



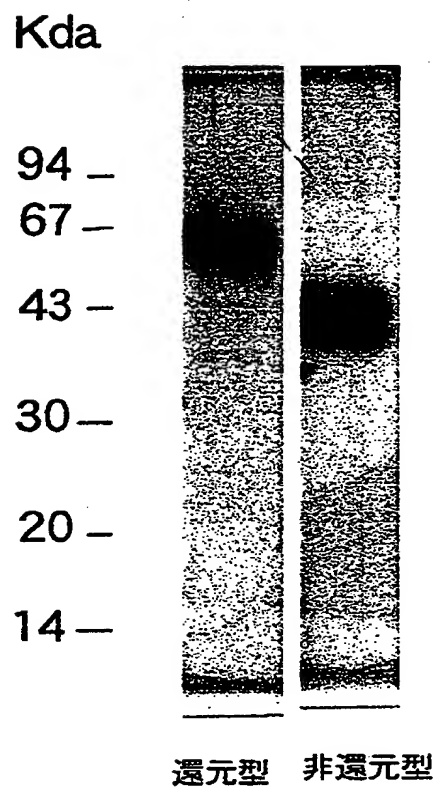
【図 12】



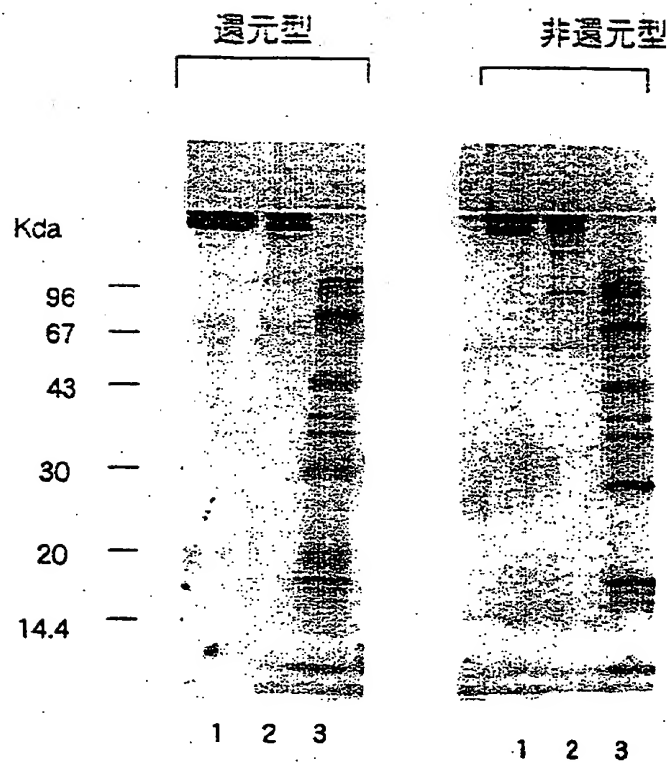
Glu-プラスミノゲン Lys-プラスミノゲン



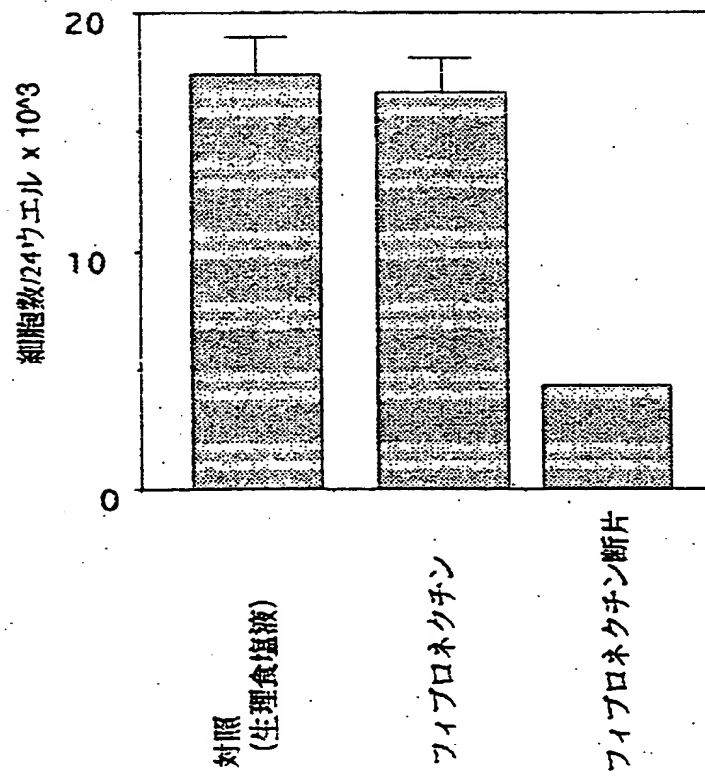
【図 13】



【図14】



【図 15】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 プラスミノゲン及びフィブロネクチンなどの血漿蛋白を分解し、癌転移増殖巣の増殖を抑制する蛋白断片を産する酵素、当該断片化蛋白質及び当該断片の調製方法を提供する。

【構成】 1.N末端のアミノ酸残基がLVRIPLHKFTで始まり非還元系SDS電気泳動で分子量約45kDa付近に認められる蛋白であり、プラスミノゲン分子種で代表される血漿蛋白を分解し癌転移増殖抑制作用を有する血漿蛋白断片を調製することのできるカテプシンD前駆体と高い相同性を示すアスパラギン酸酵素。2.当該酵素で分解し調製された癌転移増殖抑制効果を有する血漿蛋白断片。3.上記当該酵素で血漿蛋白を分解し、癌転移増殖抑制効果を有する蛋白断片を調製する方法。4.当該酵素または断片化血漿蛋白を主要構成成分とする抗癌転移増殖治療薬。

【効果】 本願発明の血漿蛋白断片化酵素または当該血漿蛋白断片化酵素によって調製される血漿蛋白断片を主成分とする癌転移増殖抑制剤は、肺癌、大腸癌に代表される固形癌等の臨床治療に利用され得る。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000173555

【住所又は居所】

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

【氏名又は名称】

財団法人化学及血清療法研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000173555]

1. 変更年月日 1996年 3月 4日
[変更理由] 住所変更
住 所 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号
氏 名 財団法人化学及血清療法研究所

